

Über die
Aminosäurezusammensetzung
von Futterpflanzen

Gerhard Schneider

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr.Dr. Johs. B r ü g g e m a n n

Über die Aminosäurezusammensetzung
von Futterpflanzen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von
Gerhard S c h n e i d e r

aus
Frankenthal

München 1957

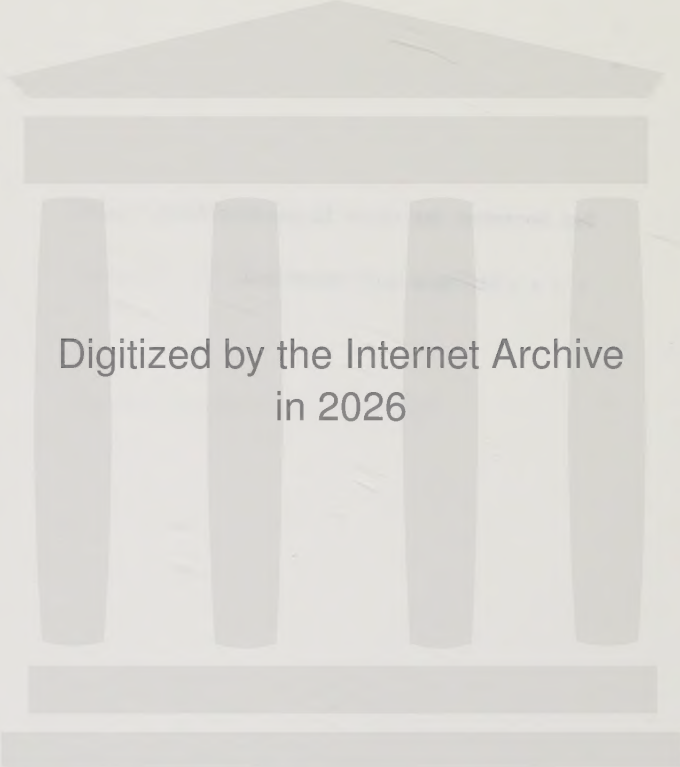
Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. L i e b m a n n

Referent: Dr. Dr. Johs. B r ü g g e m a n n

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

I. Inhalt	I
II. Gedächtnisrede des Herrn Eugen Ackermann,	2
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	2
b) Lebenslauf des Verstorbenen	3
c) Charakteristisches aus dem Leben	4
d) Gedenken des Verstorbenen	5
e) Schlusswort	6
III. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	7
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	7
b) Lebenslauf des Verstorbenen	8
c) Charakteristisches aus dem Leben	9
d) Gedenken des Verstorbenen	10
e) Schlusswort	11
IV. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	12
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	12
b) Lebenslauf des Verstorbenen	13
c) Charakteristisches aus dem Leben	14
d) Gedenken des Verstorbenen	15
e) Schlusswort	16
V. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	17
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	17
b) Lebenslauf des Verstorbenen	18
c) Charakteristisches aus dem Leben	19
d) Gedenken des Verstorbenen	20
e) Schlusswort	21
VI. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	22
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	22
b) Lebenslauf des Verstorbenen	23
c) Charakteristisches aus dem Leben	24
d) Gedenken des Verstorbenen	25
e) Schlusswort	26
VII. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	27
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	27
b) Lebenslauf des Verstorbenen	28
c) Charakteristisches aus dem Leben	29
d) Gedenken des Verstorbenen	30
e) Schlusswort	31
VIII. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	32
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	32
b) Lebenslauf des Verstorbenen	33
c) Charakteristisches aus dem Leben	34
d) Gedenken des Verstorbenen	35
e) Schlusswort	36
IX. Gedächtnisrede des Herrn Kaufmann zu Frankenthal.	37
a) Begrüßung und Ausdruck der Teilnahme	37
b) Lebenslauf des Verstorbenen	38
c) Charakteristisches aus dem Leben	39
d) Gedenken des Verstorbenen	40
e) Schlusswort	41



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Aminosäurenbestimmung im biologischen Material	3
a) Allgemeines zum Problem der Eiweißbausteinanalyse	3
b) Zusammenstellung und Bereitung der benötigten Reagentien und Geräte	4
c) Vorbereitung der Analyse	6
1) Trocknen der Pflanzen	6
2) Rohfettentzug	6
d) Die Hydrolyse	7
1) Die enzymatische Hydrolyse	7
2) Die alkalische Hydrolyse	7
3) Die saure Hydrolyse	8
a) Zeit und Temperatur bei der sauren Hydrolyse	8
b) Ansetzen der Hydrolyse	8
c) Filtrieren und Einengen	9
d) Aufnehmen und Neutralisieren	10
e) Abtrennung der aromatischen Aminosäuren	10
f) Die Papierchromatographie	13
1) Prinzip	13
2) Anwendungsbereich	18
3) Angewandtes Verfahren der Papierchromatographie	18
a) Die Filterpapierstreifen	19
b) Auftragen der Analysenflüssigkeiten und Einbringen der Streifen in die Chromatographiekammer	21
c) Die Chromatographiekammer	22
d) Lösungsmittel und Rf-Werte	22
e) Die Ninhydrinreaktion	27
4) Aufstellung der Extinktionskurven und Ausplanimetrieren	28

	Seite
5) Anmerkungen zur Chromatographie der einzelnen Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppen und deren Bewertung	28
6) Errechnung der Aminosäurenkonzentration	34
III. Die untersuchten Wiesenpflanzen	37
a) Allgemeines über die Wiesenpflanzen	37
b) Wachstumsbedingungen der Analysenpflanzen	37
c) Vergleich der Ergebnisse mit denen des Vorjahres	38
d) Besprechung der Berechnung der EAA-Indices und der biologischen Wertigkeit	43
IV. Diskussion	46
V. Zusammenfassung	55
VI. Literaturverzeichnis	56
Lebenslauf	

I. Einleitung

Das Hereinnehmen des Tieres in die Hausgemeinschaft verpflichtet den Tierhalter, nicht nur sein Tier zu füttern, sondern aus Rentabilitätsgründen es auch richtig zu füttern. Wie die Forschungsergebnisse der vergangenen Jahrzehnte zeigen, sind eine große Anzahl von Mangelkrankheiten und Ausfallserscheinungen bei unseren Haustieren darauf zurückzuführen, daß in mengenmäßig ausreichendem Futter dieses oder jenes Vitamin, dieser oder jener Mineralstoff, diese oder jene essentielle Aminosäure überhaupt nicht, bzw. unzureichend enthalten ist, oder daß das notwendige Mengenverhältnis zwischen solchen Stoffen erheblich gestört ist.

Leistungsfähigkeit und Fruchtbarkeit hängen nicht nur von der zielstrebigsten Zucht, sondern in ebenso hohem Maße auch von der passenden Ernährung ab. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für einen Viehhalter, der rentabel wirtschaften will, daß er etwas vom Futterwert der Tiernahrung weiß.

In diesem Sinne wird in der vorliegenden Arbeit ein dreifaches Ziel verfolgt:

1. Es werden ca. 20 getrocknete und ausbetanisierte Futterproben von Gräsern, Kräutern und Kleearten auf den Gehalt ihrer wichtigsten Aminosäuren im Rohprotein untersucht (s.S.40-43).
2. Durch Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen der in verschiedenen gedüngten Parzellen aufgewachsenen, gleichartigen Pflanzen soll festgestellt werden, ob überhaupt und welchen Einfluß die künstliche und natürliche Düngung auf die Aminosäurezusammensetzung des Rohproteins dieser Pflanzen ausüben (Nr. 74, 75, 76, s.S.54).
3. Auf Anregung von Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann kommt erstmalig eine Methode zur Anwendung, die es erlaubt, die wichtigsten, natürlich in Pflanzen vorkommenden Aminosäuren in einem einfachen, schnellen, dabei billigen und doch hinreichend genauen Untersuchungsgang qualitativ und quantitativ zu ermitteln.

Die Analysen erfolgten im Rahmen einer umfassenden Untersuchung über die Zusammensetzung von Wiesenpflanzen, die auf Anregung des Bayerischen Landwirtschaftsministeriums gemeinsam mit der Bayerischen Landesanstalt für Tierzucht in Grub durchgeführt wurden.

II. Aminosäurenbestimmung im biologischen Material

a) Allgemeines zum Problem der Eiweißbausteinanalyse

Schon in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts ist festgestellt worden, daß nicht alle Proteine gleich gut geeignet sind, den Stickstoffhaushalt des Körpers aufrecht zu erhalten. So wurde der Begriff der biologischen Wertigkeit (Thomass 1) begründet, der aussagt, wieviel g Körperstickstoff durch 100 g resorbierten Nahrungsstickstoff ersetzt oder gebildet werden können. Die Ursache für die verschiedenen biologischen Wertigkeiten unterschiedlicher Proteine liegt begründet in ihrer verschiedenartigen Zusammensetzung hinsichtlich der Aminosäuren, besonders der essentiellen (Abderhalden 2). Der Ermittlung der Wertigkeit eines Nahrungsrohproteins dient die Stickstoffbilanz (= Kontrolle der N-Einnahmen und N-Ausgaben). Der festgestellte Wert erlaubt jedoch keine Aussage darüber, warum dieses oder jenes Futtermittel einen hohen oder tiefen Futterwert hat. Um darüber Aufschluß zu erhalten, ist es notwendig, die Bausteine des Futtermittelrohproteins zu ermitteln. Der praktische Sinn dieser Untersuchungen liegt darin, den Anbau solcher Futtermittel mit hohem Futterwert in den landwirtschaftlichen Betrieben zu fördern und den mindereren Früchte abzuraten. Weiter ergibt sich für die tierärztliche Praxis die Möglichkeit, Krankheiten und Ausfallerscheinungen aufgrund von Mangel an essentiellen Aminosäuren zu diagnostizieren, zu bekämpfen oder besser ihnen vorzubauen.

Es ist bekannt, daß in den Futtermittelrohproteinen (nach dem Kjeldahl-Verfahren analysierter Stickstoff $\times 6,25$) Aminosäuren enthalten sind, die zum Teil in den Eiweißkörpern gebunden, zum Teil aber auch in freier Form vorliegen. Es kann dabei der prozentuale Anteil der Aminosäuren in den Eiweißkörpern ein anderer sein als derjenige in den nicht gebundenen N-haltigen Substanzen. So hat z.B. Schormüller (3) festgestellt, daß Cystin im Kartoffelglobulin, dem Tuberin, in größerem Prozentsatz vorliegt als im Rohprotein der Gesamtkartoffel. Umgekehrt aber lagen die Cystinprozentage im Gesamt-N-Extrakt vieler Nahrungsmittel höher als die im Eiweißextrakt.

Verallgemeinert ergibt sich daraus die Forderung, Eiweißbausteine ausschließlich in der gesamten Ration zu analysieren, weil wir dem Tier das

vollständige Futter vorlegen. Da nun der Wassergehalt der Pflanzen weitgehenden Schwankungen unterworfen ist, werden Aminosäuremengen nicht auf das Gesamtfuttermittel, sondern auf den Rohproteingehalt des untersuchten Materials bezogen. Nur dann können die Prozentzahlen als objektive Werte mit denen anderer Pflanzen verglichen werden.

Die folgenden Ausführungen sollen mit einer Methode bekannt machen für die unmittelbare Feststellung der Aminosäure-Konzentration in Futtermittelrohproteinen.

b) Zusammenstellung und Bereitung der benötigten Reagentien und Geräte.

1. Diaethylaether, D.A.B. 6 (M e r c k)
2. 6-n-Salzsäure (M e r c k)
3. Zinn-II-Chlorid, p.a. (M e r c k)
4. Stickstoff (N_2) in Stahlflaschen
5. N-Oktylalkohol, rein (M e r c k)
6. 20 %ige NaOH-Lösung, p.a. (M e r c k)
7. Eisessig, rein
8. 20 %ige Essigsäure
9. 5 %ige Essigsäure
10. Aktiv-Kohle (M e r c k) , verwendet in einer Korngröße von 0,06 - 0,075 mm in 5 %iger Essigsäure-Aufschlämmung. Zur Bereitung wird die Aktiv-Kohle in einer Mühle staubfein gemahlen und in Wasser aufgeschlämmt. Die Schlämmlüssigkeit wird durch ein Sieb mit der Porengröße 0,075 mm gewaschen und auf einem zweiten Sieb mit der Porengröße 0,06 mm aufgefangen. Die Körnchen in der oben angegebenen Größenordnung bleiben nach Auswaschen im zweiten Sieb zurück. Sie werden in ein Becherglas gegeben und mit 20 %iger Essigsäure eine halbe Stunde lang gekocht. Die gekochte Suspension wird abgenutscht und bei Wasserstrahlsogwirkung mit ca. 5 Liter aqua dest. ausgewaschen. Die so bearbeitete Kohle wird unter Luftabschluß in 5 %iger Essigsäure aufbewahrt. Die Prüfung der Adsorptionsfähigkeit der Aktivkohle erfolgt mit 200 mg Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, die in essigsaurer Lösung über eine Aktivkohlsäule (s.S. 11) gegeben werden. Mit 100 cm³ 5 %iger Essigsäure wird nachgespült und von je 5 ccm des Filtrats auf einen Filterpapierstreifen (Schleicher und Schüll 2043 b) 0,01 ccm aufgetragen. Der angetrocknete Streifen wird mit Ninhydrinlösung besprüht, eine Minute in eine geschlossene Wasserdampfatosphäre gehängt und dann

- 5 Minuten bei ca 85°C im Trockenschrank getrocknet. Sind danach Violettfärbungen auf dem Papier vorhanden, so sind die aromatischen Aminosäuren (s.S.) nicht von der Kohle adsorbiert worden. Die Kohle ist brauchbar, wenn der entwickelte Streifen fleckenlos bleibt.
11. Lösung von 5 % Phenol (D.A.B. 6, M e r c k) in 20 %iger Essigsäure = Elutionsflüssigkeit.
12. Lösung von 25 % Wasser in Phenol = Entwicklungsflüssigkeit für Papierchromatographie.
Die Lösung ist stets aus frisch destilliertem Phenol herzustellen und bis zum Klarwerden durchzumischen. Vor der Destillation werden dem Phenol je eine Spatelspitze Natriumbicarbonat und gekörntes Aluminium zugesetzt.
13. n-Butylalkohol, (M e r c k)
14. Lösung von 15 % Wasser in n-Butanol. Die Lösung muß wöchentlich aus frisch destilliertem Butanol hergestellt werden.
Butanol-Eisessig-Wasser; Lösung 4:1:1, wöchentlich neu herstellen und frisch destillierten Butanol und Eisessig verwenden.
15. Transparenzflüssigkeit. Mischung von Paraffinöl und -Bromnaphthalin (Brechungsindex $n_D = 1,51$)
16. Schwefelsäure konzentriert, p.a. (M e r c k)
17. Selenreaktionsgemisch nach W i e n i n g e r, p.a. (M e r c k)
18. Ninhydrinlösung, 1 %ig (nach B r ü g g e m a n n und D r e p p e r (41)
1 g Ninhydrin, p.a. (M e r c k), wird mit 10 g Phenol (D.A.B. 6, M e r c k) in 89 cm³ n-Butylalkohol gelöst.
19. Isatinlösung. 200 mg Isatin (M e r c k) werden in 96 cm³ n-Butanol und 4 cm³ Eisessig gelöst (s.S.10) (R e d f i e l d, A c h e r (44, 45)).
20. Chromatographiepapierstreifen, von der Firma Schleicher und Schüll, 2043 b oder 2043 b GL.
21. Die Chromatographiekammern sind einfache, luftdicht verglaste Winkel-eisenrahmen, die mit einer Glasplatte luftdicht geschlossen werden können. Als Chromatographiewannen kommen Tontrüge mit Emaillierung zum Gebrauch.
22. Zwei Sprüher zum Aufbringen der Entwicklungsflüssigkeiten auf die getrockneten Papierchromatogramme.
23. Extinktionsschreiber von Zeiß zum Auswerten der angefärbten Aminosäurenflecke auf den Papierchromatogrammen.

c) Vorbereitung der Analyse

In der Aufgabe, die Eiweißbausteine eines Futtermittels nicht nur qualitativ nachzuweisen, sondern auch quantitativ zu erfassen, liegt die Forderung, das Ausgangsmaterial so weit aufzuschließen, daß die zu bestimmenden Aminosäuren vollständig in freier Form vorliegen; die Behandlung muß dabei so erfolgen, daß keine Verluste auftreten können. Eingeschlossenes Eiweiß muß aus seinen Einschlußverbindungen in Freiheit gesetzt werden, und Aminosäuren zerstörende oder den Analysengang beeinträchtigende Substanzen müssen ferngehalten bzw. entfernt werden. Der Aufschluß soll jederzeit und unter gleichen Bedingungen wiederholt werden können. Diese Forderungen sind bei der zu beschreibenden Methode zur Ermittlung der Eiweißbausteine von Futterpflanzen so weit als möglich berücksichtigt.

1. Trocknen der Pflanzen

Das Trocknen der frisch geernteten Pflanzen geschieht, um irreversiblen Aminosäurenabbauvorgängen vorzubeugen, bei möglichst geringen Temperaturen und in möglichst kurzer Zeit; es wurden die untersuchten Substanzen durch mehrstündiges Erwärmen (60°) des grob zerkleinerten Materials im Vakuum bei ca. 200 Torr getrocknet oder aber durch 3-stündiges Trocknen im Umlufttrockner bei 60° . Das trockene Futter wird in einer Mühle (Condux LS 10 M) fein zermahlen, wobei die größten Teilchen nicht mehr als 0,5 mm Durchmesser haben sollen. Das erhaltene Pflanzenmehl wird unter Luftabschluß aufbewahrt.

2. Rohfettentzug

Da das in den Pflanzen enthaltene Fett den Analysengang stört, werden den Pflanzenpulvern in der Soxlethapparatur die aetherlöslichen Inhaltsstoffe entzogen. Die Extraktion ist beendet, wenn das abfließende Lösungsmittel fast farblos ist (= 8 Stunden bis mehrere Tage). Das Pflanzenmaterial wird im Digestorium vor-, dann bei 120° im Trockenschrank (Explosionsgefahr!) nachgetrocknet und unter Luftabschluß aufbewahrt; es ist das Ausgangsmaterial für die eigentliche Eiweißbausteinanalyse.

d) Die Hydrolyse

Der komplexe Zusammenhalt des Eiweißmoleküls ist durch die Peptidbindungen zwischen Amino- und Carboxylgruppen gewährleistet. Die Synthese erfordert Energiezufuhr und kommt unter Austritt von H_2O zustande.

Will man nun umgekehrt den Proteinkomplex in seine Aminosäuren zerlegen, so muß H_2O angelagert werden; dies geschieht in der Hydrolyse. Diese H_2O -Anlagerung bedeutet für den Rohproteingehalt der Untersuchungssubstanz eine Gewichtszunahme, wenn man die Gewichte der Zerlegungsprodukte addiert. Nach dem Analysenverfahren sind im Durchschnitt etwa 65 % des Rohproteins Aminosäuren, der Rest besteht aus N-haltigen Verbindungen nicht eiweißartiger Natur (Säureamide u.a.). -

F l a s c h e n t r ä g e r und L e h n a r t z (4) nennen die Hydrolyse die einzige brauchbare Methode zum Zerlegen von Proteinen.

Diese Hydrolyse kann nun mit Hilfe verschiedener Verfahren durchgeführt werden:

1. Die enzymatische Hydrolyse ist wohl die schonendste Art zur Freisetzung von Eiweißkörpern aus den Pflanzenzellen oder zur Aufspaltung der Eiweiße. Es werden hier dem suspendierten Pflanzenmaterial Fermente zugesetzt, die auf Grund ihrer Spezifität die hochmolekularen Kohlenhydrate, wie sie etwa als Zellmembranen vorhanden sind, aufspalten (z.B. Zellulasen) oder auch die Eiweißkörper in ihre Bausteine, die Aminosäuren, zerlegen (z.B. Proteasen). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in einer unkontrollierbaren, wechselnd starken Autolyse der Fermentpräparate, die dann zum Auftreten freier Aminosäuren in der Aufschlußlösung führt, die nicht aus dem zu untersuchenden Pflanzenmaterial herrühren.

2. Die alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse geht rasch vonstatten. Sie ist zu empfehlen für die Bestimmung leicht durch Oxydation zerstörbarer Aminosäuren, wie Tryptophan. D r e p p e r (5) hydrolysiert mit 20 %iger NaOH unter Zusatz von SnCl_2 in einer N_2 -Atmosphäre zur Bestimmung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, sowie Tryptophan. Er hat durch Gesamt-N-Bestimmungen dargelegt, daß die Hydrolyse vollständig ist. Nach L i n d s t r ö m (6) werden Cystin, Serin, Threonin und Arginin in allen alkalischen Hydrolysen zerstört und viele Aminosäuren racemisiert.

3. Die saure Hydrolyse

Die meisten Aminosäuren können mit Hilfe der sauren Hydrolyse in verhältnismäßig kurzer Zeit aus ihren Eiweißbindungen gelöst werden und liegen dann in freier Form als Aminosäuren oder als deren Salze vor: z.B. Chloride bei Hydrolyse mit 6-n-HCl, wie sie von Block und Bolling (7) vorgeschlagen wird. Sie ist die häufigste und erfolgreichste Hydrolysenart, sie soll auch bei der Bearbeitung der hier zu untersuchenden Pflanzen Anwendung finden. Ein Zusatz von Zinn-II-Chlorid soll durch seine Reduktionswirkung die Huminbildung verringern und die Hydrolysendauer verkürzen.

Die hochmolekularen Kohlenhydrate werden ebenfalls in saurer Hydrolyse aufgespalten; es erfolgt eine Freisetzung der in den Zellen eingeschlossenen Eiweißkörper. Tryptophan und Cystin werden in dieser Art der Hydrolyse zerstört und entziehen sich damit der Bestimmung (Block und Bolling 7). Brüggemann und Drepper (8) konnten Chloride der basischen Aminosäuren, die sie rein und mit Untersuchungsproben sauer hydrolysiert hatten, quantitativ additiv im Hydrolysat wiederfinden. Diese Feststellung erlaubt selbstverständlich keinen Rückschluß auf die Vollständigkeit des Eiweißaufschlusses; jedoch wurde dadurch ermittelt, daß die bereits aufgeschlossenen Eiweißbausteine keine Zerstörung mehr erfahren.

a) Zeit und Temperatur bei der sauren Hydrolyse

Die Vollständigkeit des Aufschlusses und die Verhütung einer Zerstörung von bestimmten Aminosäuren ist abhängig von der Temperatur und der Dauer der Hydrolyse. Die Temperatur wird auf den Siedepunkt des Gemisches eingestellt (ca. 120°C). Mit zunehmender Zeitdauer erfolgt eine immer weitgehendere Zerlegung der Eiweißkörper in Aminosäuren. Es ist aber auch zu befürchten, daß bereits vorliegende Eiweißabbauprodukte durch zu lang dauernde Hydrolysen zerstört werden. Die Hydrolysendauer muß daher in Abhängigkeit von der mehr oder weniger schnellen Aufschließbarkeit unterschiedlicher Analysensubstanzen verschieden lang sein. So braucht z.B. Mühnerei-Eiweiß weniger Zeit als Kleie.

b) Ansetzen der Hydrolyse

Wir wiegen zu unseren Aminosäurenbestimmungen 5,000 g der fettfreien trockenen Ausgangssubstanz ein und bringen sie in einen zweifach tubulierten Rundkolben von 250 ccm Fassungsvermögen, der vorher mit einigen ccm

6-n-HCl und einigen Tropfen Oktylalkohol ausgeschwenkt wurde. 100 cm³ 6-n-HCl und eine Spatelspitze Zinn-II-chlorid werden hinzu gegeben; dieses soll durch reduzierende Wirkung die Zerstörung der Aminosäuren verringern (K o f r a n y i 9). Das Gemisch schüttelt man solange, bis ein homogener Brei entstanden ist. Dann setzt man auf den mittleren Schliffhubus einen Rücklaufkühler und bringt den Kolben zum Erhitzen in ein Glycerinbad. Durch den zweiten Hubus wird die Verbindung mit einer Stahlflasche hergestellt, aus der ein schwacher Strom N₂ über die Hydrolysensubstanz zur Oxydationsverminderung streicht. Die Fl₂amme unter dem Glycerinbad wird so eingestellt, daß das Glycerin eine ständige Temperatur von 120°C aufweist. Die Hydrolyse dauert bei unseren Untersuchungen durchschnittlich 14 Stunden.

c) Filtrieren und Einengen

Nach Beendigung der Hydrolyse befindet sich im Kolben eine bernsteinfarbene bis dunkelbraune Flüssigkeit mit einigen unlöslichen Partikelchen, die zum Teil aus unzersetzten Pflanzenteilen (T ä u f e l , I v a i n s - k y l o), zum Teil aus unlöslichen, während der Hydrolyse entstandenen Huminkörpern bestehen. Der Inhalt wird nun filtriert und der Kolben mehrfach nachgespült. Auch der auf dem Filter verbleibende Rückstand muß so oft mit aqua dest. nachgespült werden (15 - 20 mal), bis alle filtrierbaren Eiweißbausteine ihn passiert haben. Praktisch ist das der Fall, wenn die aus dem Filter kommenden Tropfen neutral reagieren.

Das Filtrat enthält das Gemisch der freien Aminosäuren, die jetzt einzeln oder in Gruppen voneinander isoliert werden, um sie qualitativ und quantitativ zu beurteilen. Die Trennung ist aber in der salzsauren Lösung nicht möglich, daher wird die HCl aus dem Hydrolysat herausdestilliert. Zu diesem Zweck wird die Flüssigkeit in einen Rundkolben mit einfachem Schliffhubus in ein Wasserbad mit Siedetemperatur gebracht und im Vakuum destilliert. Um ein Aufschäumen und Überlaufen der Destillationsflüssigkeit in die Vorlage zu verhindern, wird ihre Oberflächenspannung durch Zugabe von wenigen Tropfen Oktylalkohol herabgesetzt. Es wird so lange destilliert, bis in dem Kolben aus der dünnflüssigen Ausgangsflüssigkeit eine zähe, braune Masse entstanden ist. Hier wird abermals mit ca. 40 cm³ aqua dest. aufgenommen und nach Zugabe einiger Tropfen Oktylalkohol abdestilliert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis der Destillationsrückstand fast neutral reagiert (ca. PH 6). Bei uns ist dies nach ca. 8 Wiederholungen der Fall.

d) Aufnehmen und Neutralisieren

Die Flüssigkeit wird quantitativ aufgenommen, mit einigen Tropfen 20 %iger NaHO auf den Neutralpunkt eingestellt und zu 100 ccm aufgefüllt. Die bei der Neutralisation auftretenden Trübungen in Form von weißlichen Flocken stören die weitere Bearbeitung. Deshalb wird die Flüssigkeit mit Hilfe eines unten leicht abgelenkten Glasstabes gut durchgemischt und nach und nach über einen Filter gegeben (Schleicher₃ und Schüll 995), bis 50 cm₃ Filtrat aufgefangen sind. Mit diesen 50 cm₃ wird weiter gearbeitet. Es sind darin₃ die Aminosäuren aus 2,50 g Ausgangsmaterial gelöst, wenn in den 100 cm₃ die von 5,000 g Einwage enthalten waren (s.S. 8).

e) Abtrennung der aromatischen Aminosäuren

Da sich die im Hydrolysat befindlichen Aminosäuren bzw. deren Salze bei der weiteren Analyse gegenseitig störend beeinflussen, haben T i s e - l i u s , D r a k e l und M a g d a h l (11) ein Verfahren entwickelt, das auf der T s w e t t 'schen Adsorptionschromatographie (12) beruht und erlaubt, Gruppen von Aminosäuren mit gleichen Adsorptionseigenschaften aus einem Aminosäurengemisch zu isolieren. Zur Trennung verwendeten sie folgenden Adsorbentien:

Tabelle 1:

1. Für Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin:
Aktivkohle,
2. für Arginin, Histidin, Lysin:
Wofatit C,
3. für Asparaginsäure und Glutaminsäure:
Permutit E.

Nach Abtrennung der oben genannten Aminosäuren bleiben noch

4. die neutralen Aminosäuren zurück; sie können zur Abtrennung von anderen störenden Substanzen an Wofatit KS adsorbiert werden.

Somit sind die in einem natürlichen Aminosäurengemisch befindlichen Aminosäuren in vier Gruppen getrennt.

Tabelle 2:

1. Aromatische Aminosäuren (zu denen wegen ähnlicher Adsorptionseigenschaft auch die heterocyklische Aminosäure Tryptophan gerechnet wird):

Phenylalanin,
Tyrosin,
Tryptophan.

2. Basische Aminosäuren:

Arginin,
Lysin,
Histidin.

3. Saure Aminosäuren:

Glutaminsäure,
Asparaginsäure.

4. Neutrale Aminosäuren:

Alanin,
Cystin,
Glykokoll,
Isoleuzin + Leuzin = Gesamtleuzin,
Methionin,
Prolin, Oxyprolin,
Serin,
Threonin,
Valin.

Da sich fast alle natürlichen, in Pflanzen vorkommenden Aminosäuren aus ihrem Gemisch mit Hilfe der Papierchromatographie gut trennen lassen, haben wir uns entschlossen, die zeitraubende Gruppentrennung aufzugeben und die Aminosäuren direkt aus dem Hydrolysat zu bestimmen. In einem einzigen Fall ist dies aus später darzulegenden Gründen nicht möglich und zwar bei den "Aromaten": Phenylalanin und Tyrosin (Tryptophan wird in der sauren Hydrolyse zerstört, s.S. 7) werden durch Adsorption an Aktivkohle aus dem Gemisch ausgezogen und getrennt weiterbehandelt.

Zur Herstellung der Adsorptionssäule braucht man ein ca. 6 cm langes Glasrohr mit einem Lumen von 1 cm Durchmesser und oberem Schliff. Das Lumen mündet in ein 1 mm breites Bohrloch aus. Der Boden der Säule wird mit einem watteumhüllten Glassinter-Plättchen belegt, worauf eine ca. 5 cm hohe Schicht der auf Seite 4 beschriebenen Aktivkohle pipettiert wird. Um Unregelmäßigkeiten beim Durchlaufen der Flüssigkeit vorzubeugen, muß Schichtenbildung in der Säule dadurch vermieden werden, daß die ganze Säule in einem Zug aufpipettiert wird. Die Aktivkohle darf nicht trocken laufen, da sie sonst an Oberflächenaktivität verliert. Wenn man sie nicht sofort benutzt, ist es geraten, einige cm³ 5 %iger Essigsäure darüber stehen zu lassen.

Als Vorbereitung für die Adsorption der "Aromaten" werden die 50 cm³ neutralen Hydrolysates mit 2,7 cm³ Eisessig auf eine Konzentration von 5 % Essigsäure eingestellt und auf einmal, ohne die Kohle aufzuwirbeln, auf die Säule gegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit wird auf 1 Tropfen in 5 Sekunden eingestellt. Wenn die Lösung fast durchgelaufen ist, wird mit je 20 cm³ 5 %iger Essigsäure 5 mal nachgespült. Der Durchlauf enthält alle nicht aromatischen Aminosäuren. Er wird in der Vakuumdestillationsapparatur wiederholt, bis zur Neutralisation eingeengt. Erfahrungsgemäß ist die Flüssigkeit nach zwei- bis dreimaligem Einengen neutral. Sie wird dann auf 25 cm³ aufgenommen, filtriert (Filter von Schleicher und Schüll 595) und in einem Reagenzglas im Kühlschrank bei 3°C aufbewahrt.

Die an die Aktivkohle adsorbierten "Aromaten" werden mit 250 cm³ 5 %igem Phenol in 20 %iger Essigsäure eluiert. Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen in 5 Sekunden. Nach Beendigung der Elution wird die Kohle verworfen. Das Eluat wird zwei- bis dreimal bis zur Trocknung eingeengt, mit einigen Tropfen verdünnter NaHO neutralisiert, auf 10 cm³ aufgenommen und wie oben in ein Reagenzglas filtriert, in dem es im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Beide Lösungen sollen nach spätestens zwei Wochen weiterverarbeitet sein, da irreversible chemische Umsetzungen danach zu erwarten und zu befürchten sind. Vor dem weiteren Gebrauch sind die Flüssigkeiten über dem Bunsenbrenner leicht zu erwärmen.

f) Die Papierchromatographie

1) Prinzip

Wie jedes Molekül ganz bestimmte chemisch-physikalische Eigenschaften besitzt, wie Molekulargewicht, spezifisches Gewicht, Schmelzpunkt, Siedepunkt, Kristallform, Farbe und andere mehr, die uns erlauben, ihren Träger zu erkennen, zu definieren, so besitzen viele chemische Substanzen auch eine ganz bestimmte, nur ihnen eigene Adsorbierbarkeit an oberflächenaktive Stoffe. Diese Eigenschaft macht sich die Chromatographie zunutze, um Verbindungen zu unterscheiden, die sich in vielen der oben angeführten Eigenschaften ähneln.

Läßt man einen gelösten Stoff an einem festen Stoff, einem Adsorbens, vorbeifließen, zu dem er eine Affinität besitzt, so wird er an dessen Oberfläche festgehalten, während alle neben ihm gelösten Substanzen ohne Affinität am Adsorbens vorbeilaufen. Chromatographie ist demnach Adsorption eines in Lösung befindlichen Stoffes aus seiner Lösung heraus an einen festen Stoff (Zechmeister 13). Nichts anderes ist auch der im vorigen Abschnitt geschilderte Vorgang der Abtrennung der aromatischen Aminosäuren. Er stellt im Wesen die Adsorptionschromatographie nach T s w e t t (14) dar.

Consd en, G o r d o n und M a r t i n (15) haben erstmalig Filterpapierstreifen als Adsorbens (= stationäre Phase) in der Chromatographie benutzt. Sie haben damit die Papierchromatographie begründet. Diese Methode hat große Vorteile in Bezug auf Messung der Wandergeschwindigkeit, Zeit der Analyse und technischen Aufwand. Trägt man auf den Startpunkt an einem Ende eines Filterpapierstreifens einen Tropfen einer Flüssigkeit auf, die gelöst die zu trennenden Substanzen enthält und gibt dieses Ende des Streifens so in ein Gefäß mit Lösungsflüssigkeit, daß die eingetrocknete Lösung von der absteigenden Flüssigkeit ergriffen wird, so wandern nach Überschreiten des Startpunktes durch die Lösungsmittelfront die im Lösungsmittel gelösten Stoffe mit bestimmter Geschwindigkeit nach unten (= absteigende Papierchromatographie). Nach einer gewissen Zeit befinden sich die zu trennenden Substanzen in mehr oder weniger großer Entfernung vom Ausgangspunkt und können dort als Flecke sichtbar gemacht werden (s.S.27). Die Front des absteigenden Lösungsmittels fällt entweder mit dem unteren Rand des am weitesten unten befindlichen Fleckes zusammen oder sie liegt unterhalb. Weil die Wandergeschwindigkeit

der einzelnen getrennten Substanzen eine Funktion des Lösungsmittels ist, wird sie nicht als Entfernung des Fleckes vom Startpunkt in cm angegeben, sondern als Quotient aus:

Entfernung des Fleckenmittelpunktes vom Startpunkt
Entfernung der Lösungsmittelfront vom Startpunkt.

Das Ergebnis wird Rf-Wert genannt nach den englisch sprechenden Autoren (Ratio front).

Neben der absteigenden, eindimensionalen Papierchromatographie gibt es auch noch die aufsteigende eindimensionale Papierchromatographie, die Rundfilterchromatographie und eine Zonenpapierchromatographie.

Bei der aufsteigenden Methode steigt das Lösungsmittel kraft der Kapillarität des Filterpapiers im Streifen hoch und nimmt die gelösten Substanzen mehr oder weniger schnell mit. Die Bewertung erfolgt wie bei der absteigenden Art.

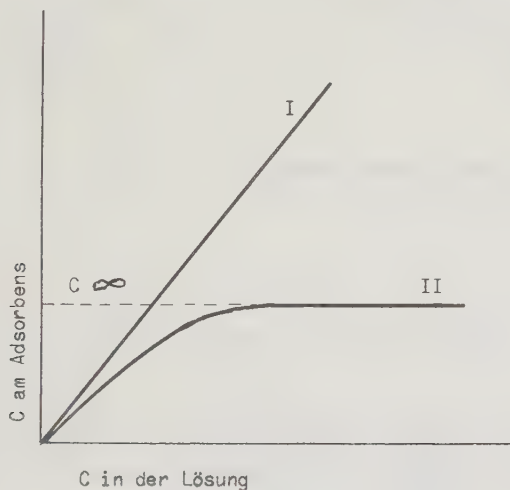
Als Startpunkt bei der Rundfilterchromatographie gilt der Mittelpunkt eines Papierbogens. Darauf wird durch eine Kapillare langsam das Lösungsmittel gegeben, das sich kreisförmig mit den gelösten Substanzen ausbreitet. Bewertet wird ein Fragment von bestimmter Größe aus jeder Zone.

In der Zonenpapierchromatographie wird ein Filterpapierstreifen mit einer halsartigen Verengung benutzt, in deren Mittelpunkt die Lösung liegt. Das aufsteigende Lösungsmittel verteilt sich nach dem Passieren des Engpasses segmentartig auf die ganze Papierbreite, mit ihm die gelöste Substanz, die wieder aus Ausschnitten bewertet wird.

Die Wanderung der Analysensubstanz im Filterpapierstreifen ist nach einigen Autoren nichts anderes als ein ständiges Hin und Her zwischen Adsorption und Elution, wobei die in Lösung befindlichen Moleküle jeweils etwas vom Lösungsmittelstrom weitergetragen werden. Ein Teil ist immer adsorbiert, der andere gelöst. Je größer die Adsorption, umso geringer der in Lösung befindliche Anteil, umso geringer die Wandergeschwindigkeit. Nach anderer Auffassung beruht die Papierchromatographie darauf, daß durch das Papier lediglich die feste, wässrige Phase stabilisiert wird, an der die organische Phase vorbei streicht. Je nach dem Löslichkeitsverhältnis der zu trennenden Substanzen in der wässrigen und organischen Phase tritt eine schnellere oder lang-

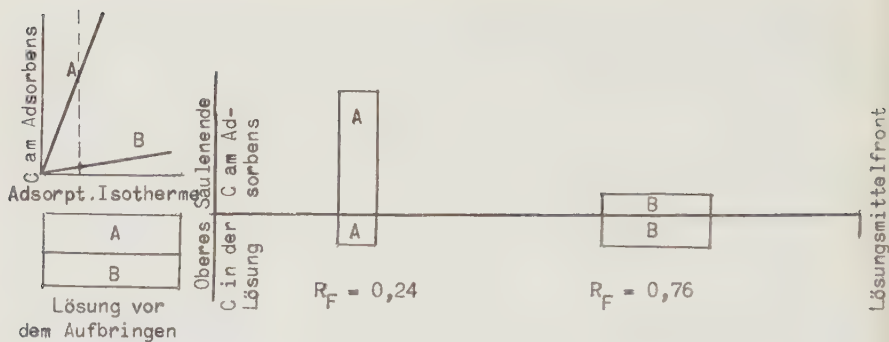
same Wanderung ein. Die Konzentrationen der zu trennenden Substanzen stehen in der festen und flüssigen Phase während des Prozesses in einem ganz bestimmten Verhältnis zueinander, einem Gleichgewichtszustand, der sich graphisch darstellen läßt.

Im idealen Fall ist am Adsorbens stets ein bestimmter Bruchteil des Gelösten adsorbiert. Die Adsorptionsisotherme stellt eine Gerade dar.



Schema 1: Ideale (I) und reale (II) Adsorptionsisothermen. C = Konzentration.

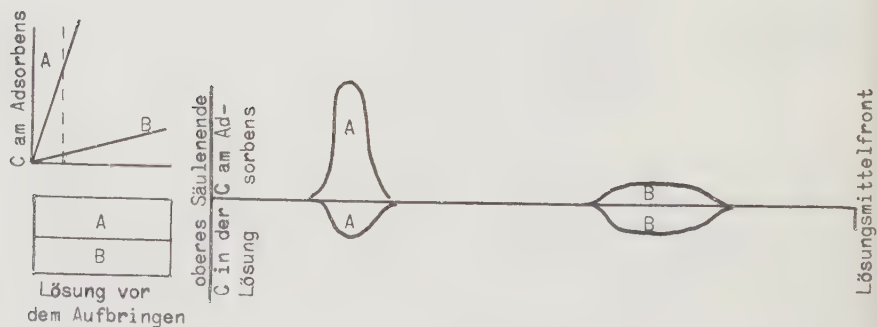
Eine Kurve stellt die Adsorptionsisotherme dann dar, wenn die Sättigungskonzentration am Adsorbens an der betreffenden Stelle erreicht ist und der gelöste Stoff in die Lösung diffundiert. Das Adsorptionsgleichgewicht ist in diesem Fall gestört. Daraus wird ersichtlich, wie wichtig es ist, mit geringen, ja geringsten Konzentrationen zu arbeiten.



Schema 2:

Darstellung eines Chromatogrammes nach Endeavour (77)

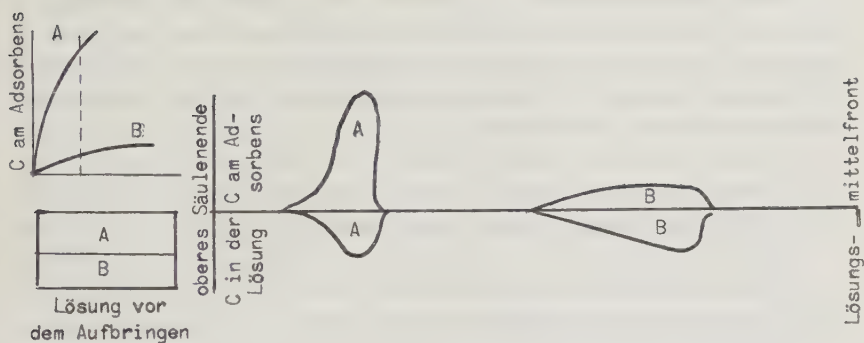
C = Konzentration



Schema 3:

Darstellung eines Chromatogrammes bei Isothermen bei Diffusion oder langsamer Einstellung des Gleichgewichtes.

C = Konzentration



Schema 4: Darstellung eines realen Adsorptionschromatogrammes,

C = Konzentration.

Auf den entwickelten Streifen wirkt sich der Gleichgewichtszustand so aus, daß im ersten Fall die Flecke scharf umrandet sind und die Farbe homogen verteilt ist. Die R_f -Werte und Mengenbestimmungen werden entsprechend genau. Im zweiten Fall sehen die Flecke kometenschweifähnlich aus (tail-Bildung), die Ränder sind unscharf und die Farbintensität ist ungleichmäßig verteilt, entsprechend der Verteilung des gesamten Stoffes. Der der Lösungsmittelfront zugekehrte Teil enthält eine größere Menge davon als der zurückliegende verblassende Teil. Die praktischen Folgen einer solchen Gleichgewichtsstörung sind ungenaue R_f -Werte. Für die spätere Mengenbestimmung (s.S. 34) stellt die ungleiche Farbverteilung eine Fehlerquelle dar.

2) Anwendungsbereich

Je kleiner die Konzentration, je größer die Genauigkeit des Verfahrens. Nach T u r b a (16, 17) sind die genauesten Werte zu erzielen, wenn die getrennten Substanzen in der Größenordnung von 5 - 100 γ vorliegen. Danach hat sich die Einwaage des Untersuchungsmaterials zu richten, an das noch weitere Forderungen gestellt werden (C r a m e r 18): Es soll

1. sowohl in Wasser als auch in der organischen Phase - wenigstens etwas - löslich sein,
2. durch chemische oder physikalische Reaktionen sichtbar gemacht werden können,
3. weder mit dem Adsorbens noch mit dem Lösungsmittel reagieren.

Diese Forderungen werden von den nachfolgend aufgeführten Stoffen erfüllt (C r a m e r 18):

Aminosäuren	org. Säuren	Phenole	Alkaloide
Peptide	Anthocyane	Antibiotika	Pterine
Proteine	Flavone	höhere Alkohol.	anorg. Ionen
Zucker	Steroide	Amine	
Purine		techn. Farbstoffe	
Nucleinsäure			

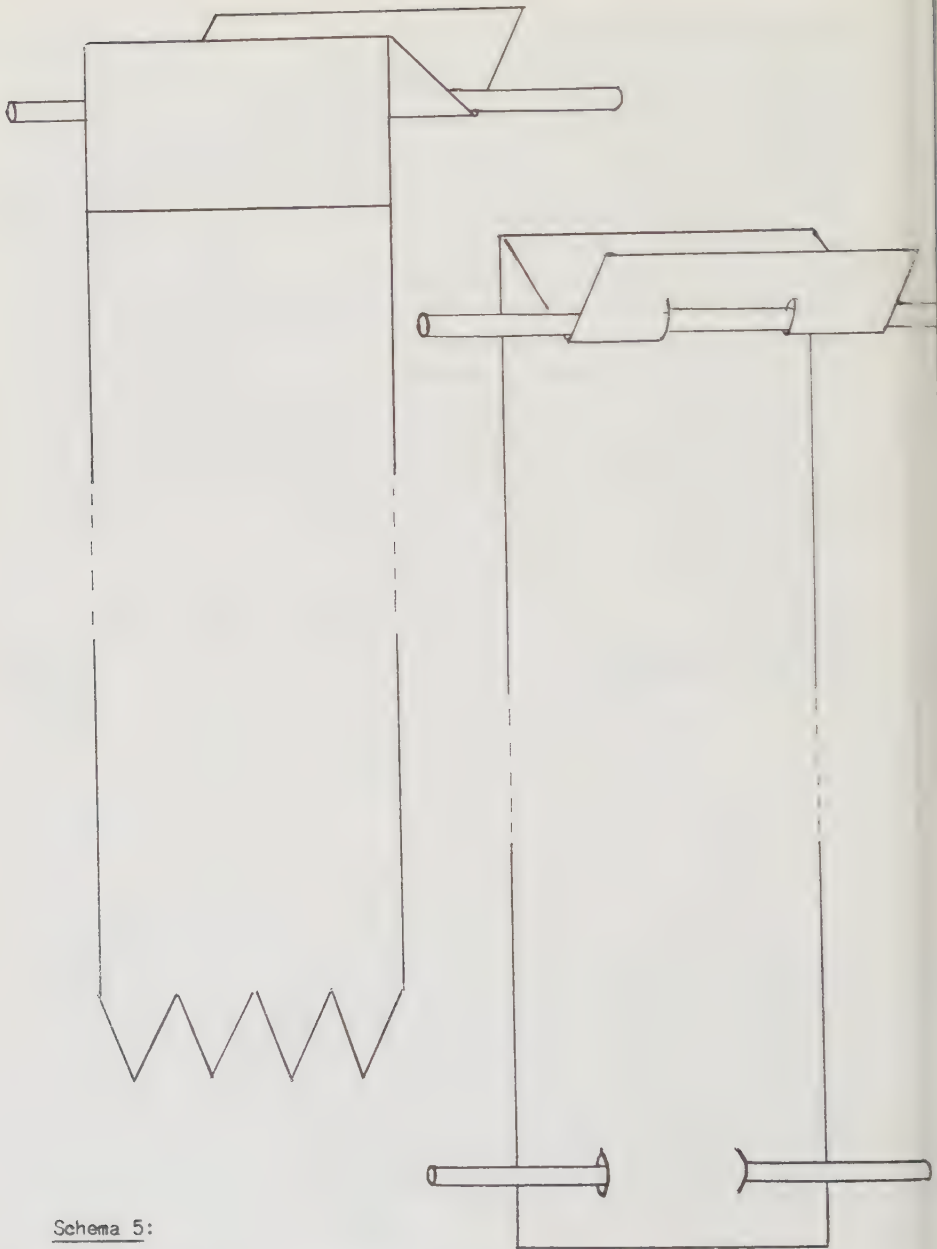
3) Angewandtes Verfahren der Papierchromatographie

Die absteigende eindimensionale Papierchromatographie erscheint besonders geeignet, die Eiweißbausteine qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Nur eine Mikromethode kommt für Mengenbestimmungen dieser Art in Frage. Es sollen die in Wiesenpflanzen vorkommenden Aminosäuren, besonders die essentiellen, auf Grund ihrer R_f -Werte (Adsorbierbarkeit) aus einem Gemisch getrennt und ihre Konzentration bestimmt werden. Die Rohproteinbestimmung nach K j e l d a h l an den gleichen Pflanzen soll es ermöglichen, die Aminosäurekonzentration im Rohprotein zu errechnen. Die nachfolgenden Abschnitte schildern den Analysengang.

a) Die Filterpapierstreifen

Es wird verwendet Filterpapier von Schleicher und Schüll 2043 b oder 2043 b GL. Die Bögen werden in 4 cm breite und ca. 55 cm lange Streifen geschnitten, deren Fasern längs verlaufen. Das obere Ende soll gerissen sein. In etwa 3 und 6 cm Abstand vom gerissenen Ende wird mit normalem Bleistift je ein Querstrich gezogen. Beim 3 cm-Strich wird das Papier nach hinten umgeknickt und in der Mitte zwischen diesem und dem Ende zurückgeknickt. Der so nach der nicht beschrifteten Seite des Papiers entstandene Falz wird in der Faserrichtung zweimal ca 1 cm vom Rand eingeschnitten, um durch die entstandenen Spalten einen Glasstab zu stecken. Der Streifen soll senkrecht an dem Glasstab hängen. Am herabhängenden Ende sollen ein paar gleichmäßig eingeschnittene Zacken beim Durchlaufen des Lösungsmittels für ein gleichmäßig verteiltes Abtropfen sorgen. Soll das Lösungsmittel nicht über den Streifen hinauslaufen, so kann man an dessen unterem Ende wie oben einen Falz zweimal einschneiden und als Beschwerer einen Glasstab hindurchstecken. (s.S. 20).

Zwischen dem 3 cm- und dem 6 cm-Strich können mit Bleistift die Bezeichnungen markiert werden, am besten : Substanz, Lösungsmittel und Anzahl der Aufträge (s.S.31)



Schema 5:

Vorbereitung der Filterpapierstreifen

b) Auftragen der Trennungsflüssigkeiten und Einbringen der Streifen in die Chromatographiekammer.

Aufgetragen werden die beiden im Kühlschrank verwahrten neutralen Flüssigkeiten, nachdem sie kurz über dem Bunsenbrenner erwärmt worden sind. Man begiebt sich beim Auftragen einer Mikropipette mit einem Inhalt von 0,01 cm³. Bevor man mit dem Auftragen beginnt, wird die Pipette ein- bis zweimal mit der Flüssigkeit durchgespült. Erst der zum dritten Mal aufgesogene Inhalt wird auf den vorbereiteten Filterpapierstreifen gebracht. Die Spitze der Pipette wird auf die Mitte des 6 cm-Striches, der Startlinie, aufgesetzt und, während die Flüssigkeit in das Papier einzieht, so weit hin- und herbewegt, daß der Wasserrand dem Papierrand nicht näher als 1 cm kommt. Auf dem Rand des Papierstreifens liegende Substanzen werden im Auswertgerät nicht erfaßt. Der Auftragsfleck soll höchstens 1 cm breit sein. Dies kann durch genügend langsames Auftragen erreicht werden. Vor jedem neuen Aufbringen von Trennungsflüssigkeit auf die Startlinie muß der alte Auftrag völlig trocken sein.

Auf Seite 18 ist angegeben, daß die besten Werte aus der Chromatographie erreicht werden, wenn die abgetrennten gesuchten Substanzen in der Größenordnung zwischen 5 - 100 γ liegen. Am angenehmsten arbeitet es sich bei Werten von 20 γ . Um diese Werte zu erreichen, ist es in unserem Fall immer nötig, mehrmals 0,01 cm³ aufzutragen (2 - 5 mal).

Die Aromaten, Phenylalanin und Tyrosin, liegen in geringer Konzentration vor; für ihre Bestimmung und ebenso für die des Prolins werden 5 mal 0,01 cm³ aufgetragen.

Alanin ist verhältnismäßig hoch konzentriert; für seine Bestimmung reicht zweimaliges Aufbringen.

Bei der Gruppe der neutralen Aminosäuren und der der basischen Aminosäuren erreicht man günstige Werte mit dreimaligem Auftrag.

Zum Schluß bleibt noch die Gruppe der sauren und neutralen Aminosäuren, in der die einzelnen Konzentrationen sich wesentlich voneinander unterscheiden. Am geringsten ist die Konzentration des Serins und 5 bis 8 mal so hoch die der Glutaminsäure. Dieser Unterschied muß mit in Kauf genommen werden, will man viele Aminosäuren auf einem Streifen und in einem Lösungsmittel chromatographieren.

Die extremen Werte bei unseren Untersuchungen liegen bei 1,5% und bei 39%. Im Durchschnitt arbeiten wir mit ca. 18%. Jede Bestimmung wird dreimal nebeneinander durchgeführt, d.h. für die Bestimmung der Aromaten werden drei Streifen 5 mal mit Trennungsflüssigkeit versehen, für die Bestimmung der "Basen" drei Streifen dreimal und drei Streifen zweimal. Auf diese Weise sollten brauchbare Durchschnittswerte erzielt werden.

c) Die Chromatographiekammer

Die auf einem Glasstab aufgereihten Chromatographiestreifen werden nach dem Eintrocknen des letzten Auftrages in der Chromatographiekammer in das jeweilige Lösungsmittel eingelegt. Die im Institut verwandten Chromatographiekammern bestehen aus einfachen Winkelleisenrahmen mit einer Grundfläche von 30 x 70 cm und einer Höhe von 65 cm, die luftdicht verglast sind. Der obere Rand ist mit einer Gummiauflage versehen, damit durch Auflegen einer Glasplatte das Innere der Kammer luftdicht abgeschlossen werden kann. Durchlässige Stellen können mit Schmierseife oder Mahnfett abgedichtet werden (C o n s d e n 18). Luftdicht soll der Kasten sein, damit die darin befindliche Luft mit dem Lösungsmitteldampf abgesättigt werden kann. Eine ausreichende Menge des Lösungsmittels in den Chromatographietrögen (vollständige Füllung) führt zu einer genügend mit Lösungsmitteldampf gesättigten Atmosphäre. Etwa 5 cm unter dem oberen Rand der Kammer verläuft eine Glasplatte durch die Mitte der Länge, auf der die Tröge mit dem Lösungsmittel ruhen. Die Unterlage darf nicht breiter sein als der obere Rand der Tröge, von dem die Streifen senkrecht und frei in die Tiefe hängen sollen. Die aufgereihten Streifen werden bei dem 3 cm-Knick über dem Trogrand gebogen, so daß sie vom Gewicht des Glasstabes in der Lösungsflüssigkeit festgehalten werden. Die Aufschrift auf den Streifen ist dem Beobachter zugewandt. Wie erwähnt, wird die Kammer durch Auflage einer Glasplatte verschlossen, auf der man zweckmäßigerweise den Zeitpunkt zum Herausnehmen mit dem Ölstift markiert.

d) Lösungsmittel und Rf-Werte

In hohem Maße hängt die Wandergeschwindigkeit der zu trennenden Substanzen vom Lösungsmittel ab. Wäre ein Lösungsmittel bekannt, von dem jede Aminosäure verschieden schnell fortgetragen wird, so könnten in einem einzigen Arbeitsgang sämtliche in einer Pflanze vorkommenden Aminosäuren voneinander getrennt und quantitativ ausgewertet werden.

Da das aber nicht der Fall ist, werden Lösungsmittel verwendet, von denen dieses die einen Aminosäuren besser trennt, jenes die anderen. Für unsere Untersuchungen haben sich nach den Erfahrungen von B r ü g g e m a n n und D r e p p e r (19) die nachfolgend aufgeführten Lösungsmittel für die Trennung der daneben stehenden Aminosäuren und deren Gruppen am besten bewährt.

Tabelle 3

Gruppe 1	(Phenylalanin, (Tyrosin,	Phenol-Wasser = 75:25
Gruppe 2	(Asparaginsäure, (Glutaminsäure, (Serin, (Glykokoll, (Threonin.	Phenol-Wasser = 75:25
Gruppe 3	(Valin, (Methionin, (Gesamt-Leuzin.	Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1
Gruppe 4	(Lysin, (Arginin, (Histidin.	Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1
Gruppe 5	Alanin.	Butanol-Wasser = 85:15
Gruppe 6	Prolin	Butanol-Eisessig-Wasser = 4:1:1

Für jede Gruppe (bezw. Aminosäure) und jedes Lösungsmittel ist die genannte Anzahl Filterpapierstreifen zu bearbeiten (s.S. 21).

Das Lösungsmittel dringt kraft der Kapillarität in den Streifen ein, überwindet die Höhe des Trograndes und wandert im Streifen abwärts, daher der Name: absteigende, eindimensionale Papierchromatographie (s.S. 13). Es ist darauf zu achten, daß sich die Lösungsmittelfront waagrecht fortbewegt. Sobald die Lösungsflüssigkeit das auf den Streifen aufgetragene Aminosäurengemisch erreicht hat, beginnen die Aminosäuren das Wechselspiel von Adsorption

und Elution, bzw. werden sie mehr oder weniger schnell von der organischen Phase nach unten fortgetragen. Je größer die Adsorbierbarkeit oder Löslichkeit in der wässrigen, festen Phase, um so kleiner die Wandergeschwindigkeit. Als Maß für die Wandergeschwindigkeit dient der Rf-Wert (s.S.13).

Da die Lösungsmittelfront immer der gelösten Aminosäure vorausseilt, ist der Nenner immer größer als der Zähler, der Rf-Wert also immer ≤ 1 . Scharfe Werte erhält man, wenn der Rf-Wert kleiner als 0,90 ist. Ist die Adsorptionsfähigkeit eines Streifens für mehrere zu trennende Substanzen sehr groß, so sind die Rf-Werte klein; das Gleiche gilt bei hoher Löslichkeit in der wässrigen Phase. Der sichtbar gemachte Fleck, der durch mehrere Substanzen bedingt ist, ist kaum vom Startpunkt getrennt. In diesem Fall kommt man doch zu einer Trennung, wenn man das Lösungsmittel so lange weiterfließen läßt, bis eine scharfe Isolierung der gesuchten Substanzen erfolgt ist. Freilich kann man jetzt nicht mehr mit dem Rf-Wert rechnen, weil ja die Lösungsmittelfront über das untere Ende des Streifens hinaus gewandert ist. Ist aber die Wanderungsreihenfolge, das "Muster", der gesuchten Substanzen bekannt, (s.S.31), so können sie auch jetzt quantitativ bestimmt werden. Genau so verfährt man, wenn zwei Aminosäurenflecke nicht scharf getrennt sind. Fallen die Adsorptionsstellen zweier Aminosäuren auf den gleichen Platz, weil sie die gleichen Rf-Werte haben, so ist die obige Trennungsmethode vergebens. Hier kommt man nur zum Ziel, wenn man beide Aminosäuren vor dem Chromatographieren schon trennt. Daher die Abtrennung der Aromaten (s.S. 10). Ist der Rf-Wert oder die Lage im "Muster" eines im Gemisch befindlichen Stoffes unbekannt, so empfiehlt es sich, einen Kontrollstreifen mit der reinen aufgetragenen Substanz parallel zu chromatographieren. Sollen Rf-Werte für Aminosäuren, die von verschiedenen Autoren gewonnen wurden, verglichen werden, so ist zu beachten, daß unterschiedliche Papiersorten und vor allem verschiedene Lösungsmittel die Rf-Werte sehr stark verändern können. Zeit und Temperatur stehen dabei in einem Abhängigkeitsverhältnis, sind aber für den Rf-Wert nicht entscheidend.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Werte von H o f f m a n n (32) angegeben; sie beziehen sich auf das Lösungsmittel Phenol-Wasser = 75:25 und Filterpapier von Schleicher und Schüll 2043 bei einer Chromatographiedauer von 20 Stunden. Zum Vergleich die Werte von W i e l a n d (33), C o n s - d e n (15) und D e c k e r (34).

Tabelle 4

Aminosäure	Rf-Werte <u>Wisland</u>	Rf-Werte <u>Consden</u>	Rf-Werte <u>Decker</u>	Rf-Werte <u>Hoffmann</u>
Cystin	-	0,30	-	0,22
Serin	0,33	0,36	0,33	0,337
Glykokoll	0,4	0,4	0,4	0,42
Threonin	0,5	0,5	-	0,495
Alanin	0,55	0,54	0,55	0,585
Cystin	-	-	-	0,69
Valin	0,78	0,77	0,78	0,76
Methionin	0,82	0,90	0,82	0,79
Leucin	0,84	0,85	0,84	0,82
Isoleucin	0,82	0,86	0,82	0,81
Prolin	0,87	-	0,87	0,81
Oxyprolin	-	0,67	0,66	-
Asparaginsäure	0,14	0,15	0,14	0,145
Glutaminsäure	0,24	0,25	0,24	0,245
Lysin	0,5	0,46	0,5	0,41
Arginin	0,67	0,59	0,67	0,61
Histidin	0,72	0,69	0,72	0,74

Tabelle 5

Nach D r e p p e r (36) sind die Rf-Werte unter gleichen Bedingungen wie bei H o f f m a n n (s.O.) für:

Tryptophan	0,78
Phenylalanin	0,85
Tyrosin	0,63

Auffallend an der vorstehend angegebenen Tabelle sind die gleichen R_f -Werte bei mehreren Aminosäuren und das nahe Beieinanderliegen anderer. Von dieser Tatsache mußten wir im Verlauf der Ausführungen mehrmals ausgehen.

Das Ergebnis der chromatographischen Trennungsmethode ist abhängig von der Art des zu trennenden Stoffes, vom Lösungsmittel und von der Beschaffenheit des Papiers. Wenn wir bei unseren Untersuchungen stets die eine gleichbleibende Papiersorte 2043 b oder 2043 b GL von Schleicher und Schüll verwenden, so bleibt uns nur die Möglichkeit, immer wirksamere Lösungsmittel zu erproben, um die Trennungsmethode zu verbessern; denn die Eigenart der Analysensubstanz bleibt immer gleich. Es trennt das eine Lösungsmittel die eine Aminosäure besser von der zweiten als das andere. Von D r e p p e r (35) wird sogar die Anwendung von 2 Lösungsmitteln hintereinander beschrieben; an den ersten Chromatographiestreifen wird einfach der zweite angenäht und nach Übertritt ins zweite Lösungsmittel verbracht. D r e p p e r (35) verwendet zuerst Phenol-Wasser 75:25 zur Abtrennung des Tyrosins von Phenylalanin und Tryptophan. Dann benutzt er ein Gemisch von Isopropanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis 4:5:1 zur Trennung von Phenylalanin und Tryptophan. Dadurch ist ein zweidimensionales aus dem praktisch eindimensionalen Verfahren geworden. Wir haben uns in unseren Untersuchungen ausschließlich für die eindimensionale absteigende Papierschromatographie entschieden und bringen dabei Lösungsmittel in Aktion, die sich als geeignete Trenner für diese oder jene Aminosäuren erwiesen haben.

Beim Herausnehmen der chromatographierten Streifen aus dem Lösungsmittel ist darauf zu achten, daß keine Lösungsflüssigkeit aus dem Trog am Streifen herabfließt, da dies Verzerrungen der Adsorptionsflecke bewirken kann. Die Streifen werden mit einem Glasstab oder mit einer an seinen beiden Enden an Draht aufgehängenen Holzleiste untergefaßt, vorsichtig vom Trogrand abgehoben und waagrecht auf einen Tisch gebreitet. Das vom Lösungsmittel nasse Ende ist mit Filterpapier abzulöschen. Erst jetzt hängt man die Streifen senkrecht in den Wind des Warmlufttrockners bis sie völlig trocken sind.

e) Die Ninhydrinreaktion

Auf den Streifen sind jetzt unsichtbar die einzelnen Flecken der getrennten Aminosäuren, die mit Hilfe der Ninhydrinreaktion (Block und Belling 36), Fischer, Pearsons, Morrison 37, Naftalin 38, van Slyke 39) sichtbar gemacht werden.

Ninhydrin reagiert nach Abspaltung der Aminogruppen (und CO_2) aus einer Aminosäure mit dem entstandenen Ammoniak und bildet eine blauviolett gefärbte Verbindung, deren Farbintensität der Menge der Aminosäure proportional ist (Hinsberg, Lang 40). So kann man durch Messung der Farbwerte auf die Menge der vorhandenen Aminosäure schließen.

Die Streifen werden auf einer Holzstellage zwischen zwei Glasstäben waagrecht ausgespannt, aus einem Sprüher mit Ninhydrinlösung (s.S. 5) solange besprüht, bis beide Seiten speckig glänzen und danach dem Trocknen überlassen, bis sie wieder matt erscheinen. Dann reht man die Papierstreifen auf einen Draht auf und hängt sie senkrecht in ein geschlossenes Dampfbad. Nach Brüggemann und Drepper (41) wird die größte Farbintensität erreicht, wenn die Ninhydrin-besprühten Streifen genau eine Minute im Dampfbad bleiben und danach genau 5 Minuten im Trockenschrank bei ca. 85°C . Diese Zeiten sind unbedingt einzuhalten. Die aus dem Trockenschrank genommenen Chromatographiepapiere tragen eine den getrennten Aminosäuren entsprechende Anzahl von violetten Flecken, die an der Luft infolge Oxydation rasch zu verblassen anfangen. Dies zu verhindern, werden die Streifen, bzw. die ausgeschnittenen, den Fleck enthaltenden, bezeichneten Stücke in Transparenzöl eingelegt (Moore, Stein 42) und zur vollständigen schnellen Durchtränkung und Entfernung der Luftbläschen ca. 15 Minuten bei 200 Torr. im Vakuumschrank belassen.

4) Aufstellung der Extinktionskurven und Ausplanimetrieren

Sofort anschließend werden die Flecken quantitativ im Extinktionsschreiber²⁾ von der Firma Zeiss ausgemessen. Zu diesem Zweck wird der Streifen aus dem Transparenzöl zwischen zwei 4 cm breite Glasplatten luftblasenfrei eingelegt. Die beiden Platten werden fest gegeneinander gepreßt, locker auf den Schieber des Apparates gelegt, der Papierblindwert (= 0) eingestellt und automatisch so über eine 32 mm lange und 1 mm breite Lichtquelle bewegt, daß jeder mm ausgeleuchtet wird. Die Strahlungsintensität der durchgehenden Strahlen ist proportional den Farbwerten und wird von mm zu mm vom Elektroschreiber als Kurve auf Millimeterpapier festgehalten. Die beiden 0-Stellen der Kurve werden durch eine Gerade verbunden und die von der Kurve umschriebene Fläche mit einem Planimeter ausgemessen.

5) Anmerkungen zur Chromatographie der einzelnen Aminosäuren bzw. Aminosäurengruppen und deren Bewertung.

Sind die mit dem Aminosäuren-Gemisch versehenen Filterpapierstreifen einmal im Lösungsmittel in der Chromatographiekammer, so läuft der Vorgang der Chromatographie von selber ab. Er ist nach einer bestimmten Zeit so weit fortgeschritten, daß die Weiterbearbeitung einsetzen kann. Die Dauer vom Einlegen der Streifen bis zu genügender Trennung der Aminosäuren ist für die einzelnen Aminosäuren und Lösungsmittel aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 6

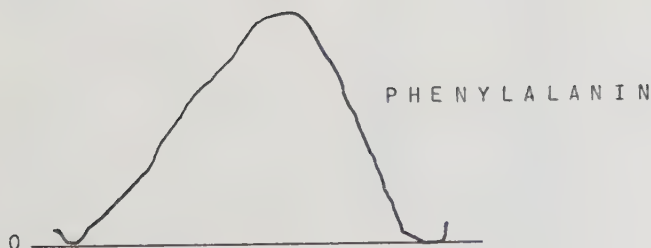
1. Gruppe: Aromaten	Phenol-Wasser ca. 36 Stunden
2. Gruppe: Saure Aminosäuren	Phenol-Wasser 48 Stunden
3. Gruppe: Neutrale Aminos.	But.-Eisessig-Wasser ca. 60 Stunden
4. Gruppe: Basische Aminos.	But.-Eisessig-Wasser 7 Tage
5. Gruppe: Alanin	Butanol-Wasser, 7 Tage
6. Gruppe: Prolin	But.-Eisessig-Wasser 24 Stunden

Weil diese Zeitangaben nicht in allen Fällen voll zuverlässig sind, die Aminosäurenflecken sich nicht alle gleichen und auch die Kurven nicht gleich sind für alle Aminosäuren, sollen im Folgenden Anmerkungen zur Chromatographie der einzelnen Aminosäuren gegeben werden.

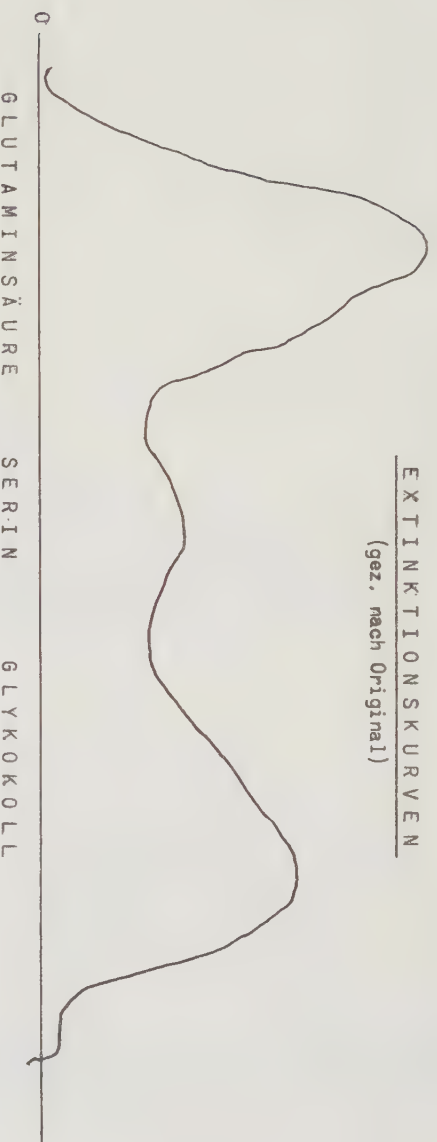
Die Streifen mit den aromatischen Aminosäuren sind zu beobachten und dann aus der Chromatographiekammer zu nehmen, wenn die Lösungsmittelfront das Streifenende erreicht hat. Erst dann sind das Phenylalanin und Tyrosin genügend scharf getrennt. Hat die Lösungsmittelfront den Streifen bereits durchgelaufen, so ist mit ihr auch ein entsprechender Teil der Aminosäure durchgelaufen und das Ergebnis nicht mehr brauchbar für die quantitative Wertbestimmung. Beide, Tyrosin und Phenylalanin, geben nach der Entwicklung langgezogene Flecken mit charakteristischer tail-Bildung (s.S. 31). Die ermittelte Kurve ist beim Tyrosin sehr flach und beim Phenylalanin gut aus-

EXTINKTIONSKURVEN

(gez. n. Original)



EXTINKTIONSKURVEN
(gez. nach Original)



Die Gruppe der sauren und neutralen Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glykokoll und Threonin) erfordert besondere Sorgfalt beim Ausmessen. Asparaginsäure ist scharf getrennt und klar auswertbar. Dagegen liegen die Glutaminsäure, das Serin und Glykokoll so nahe hintereinander (s. Rf-Werte Seite 25, Tabelle 4), daß ihre Kurven ineinander übergehen.

Lage der Aminosäure auf dem chromatographierten Streifen (Die Gruppeneinteilung entspricht der in Tab. 3 Seite 23)

PA		TY											1. Gruppe
													2. Gruppe
LE		VA		ME	TH	GL	S	GS			AS	3. Gruppe	
													4. Gruppe
													5. Gruppe
													6. Gruppe

1. Gruppe: Phenylalanin (PA) - Tyrosin (TY)
2. Gruppe: Threonin (TH) - Glykokoll (GL) - Serin (S) - Glutaminsäure (GS) - Asparaginsäure (AS)
3. Gruppe: Leuzin (LE) - Valin (VA) - Methionin (ME)
4. Gruppe: Arginin (AR) - Lysin (LY)
5. Gruppe: Alanin (AL)
6. Gruppe: Prolin (PR)
1. Gruppe: Phenol Wasser 75 : 25
2. Gruppe: Phenol Wasser 75 : 25
3. Gruppe: But.Eisess.aq.dest. 4 : 1 : 1
4. Gruppe: But.Eisess.aq.dest. 4 : 1 : 1
5. Gruppe: Butanol aq.dest. 85 : 15
6. Gruppe: But.Eisess.aq.dest. 4 : 1 : 1

Beim Planimetrieren hilft man sich so über diesen Mangel hinweg, daß man den tiefsten Punkt der Überleitungslinie senkrecht auf die Grundlinie projiziert und jeden Wert für sich mißt. Der Threoninfleck macht keine Schwierigkeit. Um der Genauigkeit willen empfiehlt es sich, die Streifen mit der 2. Gruppe genügend lang "laufen" zu lassen.

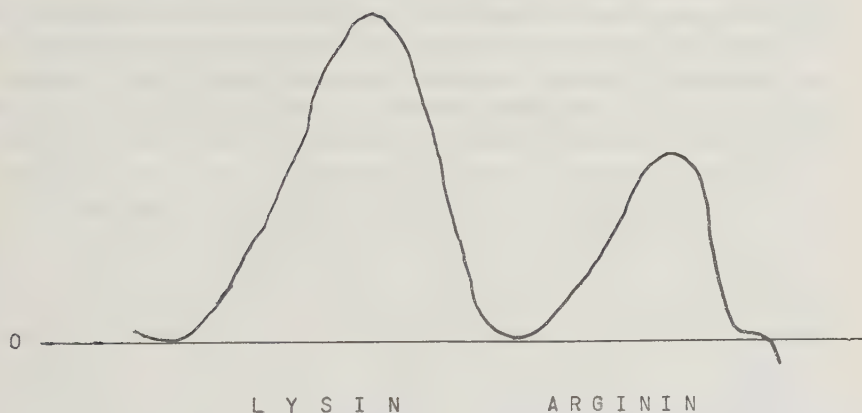
Die neutralen Aminosäuren werden auf drei Streifen dreimal aufgetragen und auf weitere drei Streifen zweimal, um möglichst genaue Werte zu erhalten. Nach der Laufzeit ist die Lage des Leuzins nahe dem unteren Rand des Streifens. Nach B u r i (43) bilden Leuzin und Isoleuzin einen gemeinsamen homogen gefärbten gut umrandeten Fleck (= Ges. Leuzin) (s.S. 23 Tabelle 3).

Das Valin liegt ein bis zwei Finger breit über dem Leuzin, und dicht darüber ist das Methionin zu finden. Die Methioninflecke waren bei den untersuchten Pflanzenmaterialien so schwach, daß sie im Meßgerät nicht bewertet werden konnten; sie wurden in der Konzentration geschätzt. Oft war Methionin überhaupt nicht zu finden.

Auch bei der Gruppe der basischen Aminosäuren werden 3 Streifen mit dreimaligem und drei mit zweimaligem Auftrag chromatographiert. Auf Grund ihrer geringen Laufgeschwindigkeit werden die basischen Aminosäuren sehr lange (7 Tage) im Lösungsmittel hängen gelassen. Trotzdem entfernen sie sich nicht weit vom Startpunkt, sind aber meist doch scharf getrennt. Histidin (zwischen Lysin und Arginin zu suchen) war bei der hier durchgeführten Untersuchung in keinem Fall aufzufinden. Die beiden anderen Werte sind als gut zu bezeichnen.

EXTINKTIONSKURVEN

(gez. nach Original)

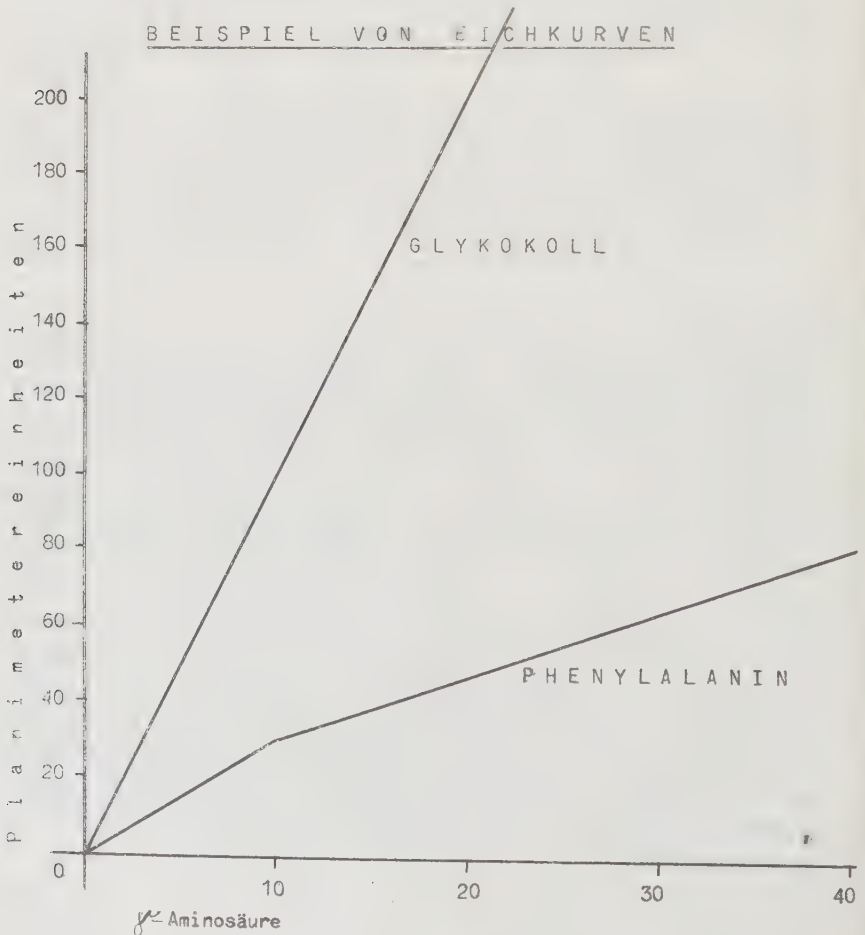


Das Alanin ist am besten mit Butanol-Wasser 85:15 zu trennen. Nach einwöchiger Chromatographie ist es allein auf der Mitte des Streifens als gleichmäßig gefärbter und scharf umrandeter Fleck wahrzunehmen.

Die kürzeste Laufzeit hat Prolin mit 24 Stunden in Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1. Es ist etwa auf der Mitte des Streifens zu finden und färbt sich mit Ninhydrin nur schwach gelb. Deshalb wird es nach Redfield (44) und Achter (45) mit Isatin gefärbt. Der trockene Streifen wird zwischen zwei Glasstäben waagrecht ausgespannt, die vermutliche Adsorptionsstelle auf ca. 10 cm Länge, um mit Sicherheit alles Prolin zu erfassen, mit Isatinlösung (s.S. 5) besprüht, bis die besprühte Stelle von beiden Seiten speckig glänzt. Ist die Isatinlösung so weit getrocknet, daß die Sprühstelle matt erscheint, so wird der Streifen 10 Minuten in Wasserdampf gehängt und danach 15 Minuten im Trockenschrank bei ca. 85°C getrocknet. Das Prolin bildet einen homogenen, wohl begrenzten blauen Fleck, der gut auszuwerten ist.

6) Errechnung der Aminosäurenkonzentration im Rohprotein

Zur Errechnung der Aminosäurenkonzentrationen aus den ermittelten Flächenwerten der Extinktionskurven finden Eichkurven Verwendung, die entsprechend dem geschilderten papierchromatographischen Aufarbeitungsgang aus bekannten Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren entwickelt werden. Durch Vergleich der Flächenwerte der unbekannten Konzentrationen mit diesen Eichkurven kann die entsprechende Menge Aminosäure in γ ermittelt werden.



Dieses Ergebnis sagt jedoch als Zahl nicht viel; es muß in Beziehung zum Gewicht und zum Rohproteingehalt der Ausgangssubstanz gebracht werden. Erst dann werden brauchbare Vergleichswerte erhalten.

Der nachfolgende Abschnitt soll den Rechnungsweg erklären.

Wie auf Seite 21 geschildert, wird das Aminosäuren-Gemisch in bestimmter Konzentration ein- oder mehrmals mit der Mikropipette auf den Filterpapierstreifen gebracht. Bei der Flächenberechnung der Kurven (s.o.) teilen wir die Durchnittswerte aus den drei bezw. sechs Parallelversuchen bereits durch die Anzahl der Aufträge und erhalten auf diese Weise γ -Werte, die sich auf einen einzelnen Auftrag, also auf 0,01 cm³ Lösung, beziehen.

Sind nun z.B. in 0,01 cm³ 8,2 γ (Glykokoll-Rotklee 1. Parz.)
so sind in 10,00 cm³ 8200 γ = 8,2 mg

Wir haben unser Aminosäurengemisch zu 25 cm³ aufgenommen (s.S. 12), darin haben wir also

$$\text{in 25 cm}^3 \quad 2,5 \times 8,2 = 20,5 \text{ mg Glykokoll}$$

In den 25 cm³ Lösung sind die Aminosäuren aus 2,5 g der getrockneten Ausgangssubstanz enthalten, da wir die 5 g Untersuchungssubstanz zu 100 aufgenommen hatten und die Menge geteilt haben (s.S. 10). Wenn nun in 25 Kubikzentimetern Lösung 20,5 mg Glykokoll enthalten sind, so bezieht sich diese Zahl auf die 2,5 Gramm gelöste Substanz. Für 25 cm³ setzen wir 2,5 g und darin sind 20,5 mg Glykokoll.

Es sind in 2,5 g Trockensubstanz 20,5 mg Glykokoll
und in 100 g Trockensubstanz 820 mg Glykokoll
= 0,82 %.

Der Prozentsatz der Aminosäuren in der Trockensubstanz entspricht also bei den hier verwendeten Mengen und Verdünnungen:

$$\frac{\text{Aminosäure in 0,01 cm}^3}{10} = \% \text{ Aminosäure in der Trockensubstanz}$$

Anders verhält es sich bei der Gruppe der Aromaten, die wir auf 10 cm³ aufnehmen (s.S. 12). Hier muß das Ergebnis immer vollständig nach der obigen Methode berechnet werden, weil in den 10 cm³ die Aromaten von 2,5 g Substanz enthalten sind.

Das Ergebnis des obigen Rechenverfahrens sagt aus, wieviel % Aminosäure in der getrockneten Substanz eines Futtermittels vorliegen. Um darüber hinaus den Prozentgehalt der Aminosäuren im Rohprotein (nach der Kjeldahl-Methode analysiert $\times 6,25$) festzustellen, dies ist die einzig mögliche Vergleichsbasis für die Aminosäuren-Gehalte in verschiedenen Futtermitteln, wird mit Hilfe der Kjeldahl-Methode der Rohproteingehalt der verschiedenen trockenen Substanzen bestimmt und dann folgende Berechnung angestellt:

Beispiel Glykokoll Rotklee 1. Parz.

$$\frac{\% \text{ Glykokoll in } 100 \text{ g Substanz} = 0,82}{\% \text{ Rohprotein in } 100 \text{ g Substanz} = 19,24} = \frac{x}{100}$$

$x = 4,25$ % Glykokoll im Rohprotein. - Die so berechneten Aminosäuregehalte entsprechen den Zahlen in den Tabellen (s.S. 40, 41, 42 Tabelle 7).

III. Die untersuchten Wiesenpflanzen

a) Allgemeines über die Wiesenpflanzen

Auf dem deutschen Grünland gedeihen ca. 1000 Arten von Gräsern, Kräutern und von Klee. Davon sind etwa 400 eigentliche Grünlandpflanzen. 60 kommen auf mehr als der Hälfte des Grünlandes vor. Die wertvollen Futterpflanzen unserer Landwirtschaft werden von ungefähr 85 Arten gebildet. Die sogenannten Unkräuter sind darin natürlich nicht enthalten; aber auch sie verdienen, auf ihren evtl. Futterwert bzw. ihre Verwertungsmöglichkeit untersucht zu werden.

b) Wachstumsbedingungen der Analysenpflanzen

Die nachfolgend aufgezählten Pflanzen, die hier untersucht wurden, sind auf dem Versuchsland des Boschhofes bei Wolfratshausen in Oberbayern gewachsen. Sie standen unter gleichen Klimabedingungen, wuchsen aber in mehreren Parzellen auf verschieden gedüngtem Boden. Es handelt sich um einen Hochmoor-Moosboden (Rohhumusboden) mit 92,14 % organischer Substanz und einem pH-Wert von 4,9. Der Kaliumgehalt ist gering, Phosphor dagegen ist genügend vorhanden. Die Niederschlagsmenge in diesem Gebiet ist sehr groß. Das Land wurde 1946 als Wiese angesät und seitdem angeblich nur mit Stallmist und Gülle gedüngt. Zweimal im Jahr wurde die Wiese geschnitten und anschließend als Herbstweide benutzt.

1954 erfolgte nach dem ersten Schnitt (Mai) nachstehend angeführte Düngung:

Düngungsplan

Parzelle 1: Nur Spurenelemente, 550 g Borax, 270 g Magnesiumsulfat, 152 g Kupfersulfat, 90 g Zinksulfat und 5 g Kobaltsulfat pro 2500 qm.

Parzelle 2: 100 kg Volldünger (11 % N, 13 % P, 12 % K, 5 % Mg SO₄) + die in Parzelle 1 angegebenen Spurenelemente pro 2500 qm.

Parzelle 4: blieb als Vergleich ungedüngt.

1955 wurde im März in der gleichen Weise gedüngt. Nur auf die Parzelle 4 wurde Stallmist gebracht. Eine Spurenelementanalyse erfolgte in beiden Fällen im 2. Schnitt mit dem Ergebnis, daß zwischen Spurenelementdüngung und Spurenelementgehalt der Pflanzenasche keine Beziehung besteht. Durch Volldüngung konnte eine geringe Ertragssteigerung erzielt werden.

Am 8. August 1955 wurden nachfolgende Pflanzen geerntet und dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere zu Analysenzwecken übergeben:

Gräser:	1.) <i>Poa pratensis</i>	Wiesenrispe
	2.) <i>Phleum pratensis</i>	Lieschgras
	3.) <i>Phalaris arudinacea</i>	Rohrglanzgras
Kleearten:	1.) <i>Trifolium pratensis</i>	Rotklee
	2.) <i>Trifolium repens</i>	Weißklee
Kräuter:	1.) <i>Ranunculus acer et</i> <i>repens</i>	Hahnenfuß
	2.) <i>Achillea millifolium</i>	Schafgarbe
	3.) <i>Taraxacum officinalis</i>	Löwenzahn

Die geernteten Pflanzen wurden ausbotanisiert, im Umlauftrockner bei ca. 60° getrocknet und in Glasgefäßen mit Schliffkolben aufbewahrt. Sie wurden nach der vorne beschriebenen Methode auf Aminosäuren analysiert. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 7.

c) Vergleich der Ergebnisse mit denen des Vorjahres

Die gleichen Pflanzen wurden auch im Vorjahr in ähnlichem Verfahren im hiesigen Institut analysiert. Die Ergebnisse darüber zeigten mit nachfolgenden Tabellen annähernd übereinstimmende Werte. Daraus ergibt sich die berechnete Vermutung, daß die Aminosäurezusammensetzung der Pflanzeneiweißkörper konstant ist. Bei den Tabellenwerten zu berücksichtigen ist die Fehlergrenze des Untersuchungsverfahrens, die bei $\pm 5\%$ bis $\pm 10\%$ liegt. In den Tabellen sind die Werte für Tryptophan, Histidin und teilweise auch für Methionin in Klammern gesetzt, weil sie die Durchschnittswerte des Vorjahres mit darstellen. Bei der beschriebenen Methode wird das Tryptophan in der sauren Hydrolyse vollständig zerstört (s. S. 8); das Histidin und das Methionin lagen in so geringen Mengen vor (s. S. 31), daß diese Aminosäuren im Extinktionsschreiber teilweise nicht mehr bewertet werden konnten.

Tabelle 7

Aminosäurenkonzentration im Rohprotein der untersuchten Wiesenpflanzen

	<u>Poa pratensis</u>			<u>Phleum pratensis</u>			<u>Phalaris arundinacea</u>
	Wiesenrispe			Lieschgras			Rohrglanzgras
	Parz. 1	Parz. 2	Parz. 4	Parz. 1	Parz. 2	Parz. 4	Parz. 1
Rohprotein in der fettfreien getrock- neten Substanz	17,60	17,75	18,37	13,20	13,34	12,75	14,28
Aminosäurenkonzentration in % des Rohproteins (N x 6,25)							
Tyrosin	2,58	2,14	1,43	2,51	2,35	1,79	1,03
(Tryptophan)	(1,60)	(1,60)	(1,60)	(0,95)	(0,95)	(0,95)	(0,95)
Phenylalanin	2,56	2,14	1,05	2,51	2,20	1,55	1,34
Lysin	2,65	6,00	5,37	2,97	3,11	4,95	6,35
(Histidin)	(2,40)	(2,40)	(2,40)	(1,80)	(1,80)	(1,80)	(1,80)
Arginin	4,84	6,22	5,15	3,74	3,96	5,10	4,49
Threonin	2,27	2,54	3,14	3,64	2,26	1,97	2,14
Methionin	(1,46)	(1,46)	(1,46)	(1,60)	(1,60)	(1,26)	(1,50)
Valin	5,10	5,64	5,86	2,95	4,14	5,65	5,72
Gesamt-Leucin	8,65	11,35	12,90	11,50	12,45	9,30	10,43
Serin	2,16	2,59	2,17	3,27	3,48	2,42	2,93
Glykokoll	3,96	4,44	5,14	4,46	4,06	4,00	3,38
Alanin	3,38	3,99	3,85	4,70	5,06	2,67	2,06
Asparaginsäure	4,61	6,85	5,00	3,51	4,38	6,90	3,33
Glutaminsäure	7,96	9,35	11,58	8,58	11,30	7,39	8,15
Prolin	0,74	0,50	0,60	0,53	0,75	1,18	1,03
Summe der Aminosäuren in % des Rohproteins	55,82	69,11	68,70	58,62	63,85	58,83	57,23

	<u>Ranunculus acer</u> <u>et repens</u> Hahnenfuß		<u>Achillea millefolium</u> Schafgarbe		<u>Taraxacum offic.</u> Löwenzahn	
	Parz. 2	Parz. 1	Parz. 2	Parz. 4	Parz. 1	Parz. 2
Rohprotein in der fettfreien getrock- neten Substanz	13,26	14,55	14,21	13,89	14,86	18,42
Aminosäurenkonzentration in % des Rohproteins (N x 6,25)						
Tyrosin	1,96	1,92	1,35	2,52	0,81	1,27
(Tryptophan)	(1,00)	(0,64)	(0,64)	(0,64)	(0,57)	(0,57)
Phenylalanin	2,18	1,92	1,68	2,67	1,44	1,90
Lysin	8,99	3,12	2,96	4,02	5,09	5,32
(Histidin)	(2,20)	(1,40)	(1,40)	(1,40)	(1,40)	(1,40)
Arginin	4,02	4,89	4,94	6,53	4,57	3,52
Threonin	3,38	2,07	2,46	3,38	3,76	3,99
Methionin	(1,00)	(1,25)	(1,25)	(1,25)	(1,00)	(1,00)
Valin	7,89	3,52	4,77	5,65	6,40	5,81
Gesamt-Leucin	12,22	9,00	11,00	15,60	16,35	16,28
Serin	2,26	1,51	1,90	1,80	1,48	1,62
Glykokoll	6,02	3,87	4,14	5,18	5,78	6,28
Alanin	3,31	2,91	2,81	2,30	4,17	3,69
Asparaginsäure	3,02	3,78	2,93	7,20	6,05	5,75
Glutaminsäure	10,65	8,91	13,80	11,90	12,78	12,59
Prolin	1,76	3,16	2,67	1,80	1,81	2,73
Summe der Aminosäuren in % des Rohproteins	69,86	53,88	60,08	72,74	73,74	73,70

	<u>Trifolium pratensis</u>			<u>Trifolium repens</u>		
	Rotklee			Weißklee		
	Parz. 1	Parz. 2	Parz. 4	Parz. 1	Parz. 2	Parz. 4
Rohprotein in der fettfreien getrock- neten Substanz	19,24	20,31	24,32	20,71	19,84	19,35
Aminosäurenkonzentration in % des Rohproteins (N x 6,25)						
Tyrosin	1,29	1,97	1,17	1,39	1,40	1,86
{ Tryptophan)	(1,50)	(1,50)	(1,50)	(1,60)	(1,60)	(1,60)
Phenylalanin	1,23	1,48	0,94	1,40	2,11	1,96
Lysin	5,82	3,07	3,20	5,32	5,54	4,33
(Histidin)	(1,00)	(1,00)	(1,00)	(2,10)	(2,10)	(2,10)
Arginin	6,15	2,63	4,39	5,74	5,84	3,35
Threonin	2,85	2,91	2,76	3,23	3,74	2,99
Methionin	1,76	(2,10)	(2,10)	(1,55)	(1,55)	1,01
Valin	6,89	4,45	3,73	7,19	8,36	6,30
Gesamt-Leucin	15,30	13,10	10,55	20,30	16,63	20,41
Serin	1,67	2,43	1,93	1,01	0,75	1,60
Glykokoll	4,25	4,04	3,38	3,14	3,12	2,93
Alanin	2,95	4,45	1,90	4,25	4,13	2,99
Asparaginsäure	4,34	5,35	4,20	4,82	4,78	5,16
Glutaminsäure	10,60	12,85	8,63	9,65	7,56	8,11
Prolin	1,77	1,49	1,81	2,03	1,76	1,80
Summe der Aminosäuren in % des Rohprotein	69,37	64,82	53,30	74,62	70,95	68,90



d) Berechnung der EAA-Indices und der biologischen Wertigkeit

Im Rohprotein sind nicht nur die Aminosäuren enthalten, sondern auch andere für die Ernährung mancher Tierarten geringer einzuschätzende stickstoffhaltige Substanzen. Der hohe Rohproteingehalt einer Pflanze ist somit kein Anzeichen für den hohen Nahrungswert einer Pflanze. Doch in Hinsicht auf eventuelle Düngungsunterschiede und als Bezugsgröße für die Aminosäuren sei hier der Rohproteingehalt besprochen. Er ist nicht bei gleichen Pflanzen verschiedenartiger Parzellen gleich; sondern schwankt ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit. Insgesamt schwankt er zwischen 12,75 % (Phleum pratensis, 4. Parzelle) und 24,32 % (Trifolium pratensis, 4. Parzelle) in der trockenen Substanz.

Im Durchschnitt liegen:

Phleum pratensis mit 13,9 % Rohprotein in der trockenen Substanz am niedrigsten. Es folgen:

Ranunculus acer et repens mit 13,26 % in der Trockensubstanz

Achillea millifolium	"	14,21 %	"	"	"
Phalaris arundinacea	"	14,28 %	"	"	"
Taraxacum officinalis	"	16,64 %	"	"	"
Poa pratensis	"	17,90 %	"	"	"
Trifolium repens	"	19,90 %	"	"	"
Trifolium pratensis	"	21,29 %	"	"	"

Den größten Gesamtdurchschnitt an Rohprotein in der Trockensubstanz haben die Kleearten: 20,59 %; es folgen nach unten die Kräuter mit 15,09 % und die Gräser mit 14,70 % Rohprotein in der trockenen Substanz.

Zum Aufbau des körpereigenen Eiweißes benutzt der tierische Organismus die stickstoffhaltigen Substanzen der zugeführten Nahrung. Einige Aminosäuren ist er in der Lage selbst zu synthetisieren und zwar sowohl aus solchen Stickstoffverbindungen, die nicht Aminosäuren sind, als auch aus Aminosäuren anderer Art. Das sind die nicht essentiellen Aminosäuren wie Serin, Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Prolin. Andere Aminosäuren müssen dem Organismus mit der Nahrung zugeführt werden, die essentiellen. Es gibt außerdem noch semiessentielle Aminosäuren. Nehmen wir an, einem Organismus steht genügend Stickstoff zur Synthese von nicht essentiellen Aminosäuren zur Verfügung, es fehlen ihm aber die essentiellen, so ist der Aufbau der Eiweißmoleküle nicht möglich. Mangelkrankheiten und Ausfallserscheinungen sind die Folge. Hat aber ein Organismus die ihm

arteigenen, in bestimmten Mengenverhältnissen notwendigen essentiellen Aminosäuren greifbar, so kann er die in der Eiweißkonstruktion fehlenden nicht essentiellen Aminosäuren aus diesen essentiellen Eiweißbausteinen (wenn sie reichlich vorhanden sind) oder ihren Abbauprodukten oder aus anderen stickstoffhaltigen Nahrungssubstanzen selbst herstellen. Die essentiellen Aminosäuren geben demnach den Ausschlag für den Wert des Rohproteins einer Futterpflanze. Es ist daher angebracht, die tierartlich spezifischen Bedarfswerte (Almqvist 50, Besson 51) an essentiellen Aminosäuren mit den Gehaltsangaben der verschiedenen Futtermittel zu vergleichen. Dies ist mit Hilfe der angegebenen Tabellen möglich. Stellt sich dabei heraus, daß ein Eiweißbaustein fehlt, so kann durch gleichzeitige Zufütterung von reinen Aminosäuren der Mangel ausgeglichen werden. Auf die Gleichzeitigkeit ist dabei besondere Aufmerksamkeit zu lenken; denn nur wenn alle Eiweißbausteine gleichzeitig und untereinander im entsprechenden Mengenverhältnis am Bedarfsort vorliegen, kann das Tier spezifisches, körpereigenes Eiweiß daraus produzieren (Geiger 52).

Einen weiteren Fortschritt zur Beurteilung des Wertes von Pflanzenfuttern bedeutet die Schaffung des EAA (= Essential Amino Acid) Index von Oser (53). Der EAA Index errechnet sich nach der Formel:

$$\text{EAA Index} = \frac{a \cdot 100}{a_e} = \frac{b \cdot 100}{b_e} \dots \times \frac{k \cdot 100}{k_e}$$

a, b k = % Essentielle Aminosäuren im Rohprotein eines Futtermittels oder einer Futtermittelmischung (Ration).

$a_e, b_e \dots k_e$ = % Essentielle Aminosäuren im Rohprotein des Volleies.

In dieser Formel wird jede essentielle Aminosäure eines Futtermittels oder einer Ration jeder entsprechenden essentiellen Aminosäure des Volleiproteins gegenübergestellt und auf 100 bezogen. Die einzelnen Ergebnisse werden miteinander multipliziert und aus der Multiplikationssumme die 10. Wurzel gezogen. Würden wir für $a = a_e$ setzen und $b = b_e$ usw., so erhielten wir als EAA Index = 100 (= EAA Index des Volleiproteins). Die EAA Indices der untersuchten Produkte aber werden als Prozent-Nahrungswert des Volleies aufgefaßt.

Tabelle 8

Die EAA-Indices unserer Untersuchungspflanzen

	1. Parzelle	2. Parzelle	4. Parzelle
<i>Poa pratensis</i>	58,64	66,16	56,84
<i>Phleum pratensis</i>	54,69	53,55	52,47
<i>Phalaris arundinacea</i>	51,58		

<i>Ranunculus acer et respens</i>		62,20	
<i>Achillea millifolium</i>	45,93	45,60	60,05
<i>Taraxacum offic.</i>	49,31	51,66	

<i>Trifolium pratensis</i>	59,69	50,60	47,18
<i>Trifolium repens</i>	55,96	53,91	60,87

Die errechneten EAA-Indices der Untersuchungspflanzen liegen im Durchschnitt in der Größenordnung 50 bis 62 (Vollprotein 100) und weisen auf die beträchtliche Futterwertigkeit unserer Wiesenpflanzen hin. Für die ausgefallenen hohen EAA-Indices bei *Poa pratensis* 2. Parzelle und *Achillea millifolium* 4. Parzelle kann keine Erklärung gegeben werden. Die Schwankungen können in der Analyse begründet sein aber auch in der Zusammensetzung der Untersuchungsproben. Die EAA-Indices unterliegen selbstverständlich auch wieder der Fehlbarkeit des Aminosäuren-Bestimmungsverfahrens.

IV. Diskussion

Richtig füttern heißt, dem Nutztier diejenige Menge und Qualität an Futtermitteln anzubieten, die seinen Bedarf befriedigen. Der Bedarf richtet sich weitgehend nach dem Alter, der Größe, den Lebensbedingungen und den von dem Tier geforderten Leistungen. Für eine ideale Fütterung wäre es also notwendig, die Bedarfszahlen für Eiweiß, Stärke, Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente und unverdauliche Masse, für Gattung, Rasse, Alter, Geschlechtszustand und Leistung genau festzulegen. Anhand dieser Angaben könnte eine immer rationellere Ernährung unserer Tiere angestrebt werden.

Kellner (54) hat in seinen Futtertabellen das Mengenverhältnis von verdaulichem Rohprotein-Stärkewert zur Grundlage gemacht und mit seinen Angaben der Landwirtschaft eine wertvolle Handhabe für die Tierfütterung geschaffen. Mit fortschreitender Intensivierung der Viehwirtschaft reichten die Kellner-Tabellen aber nicht mehr aus, weil sie sich ausschließlich auf die Mengen, nicht aber auf die Qualität der Nährstoffe beziehen. Was die Kohlenhydrate, die Stärke betrifft, so kann man sagen, daß sie in der üblichen Tiernahrung für durchschnittliche Leistungen in genügender Quantität und Güte vorhanden sind; das gleiche gilt für die stickstoffhaltigen Substanzen der Nahrung. Sollen jedoch optimale Leistungen erzielt werden, so sind sowohl hinsichtlich der energiebringenden Nahrungsinhaltsstoffe, besonders aber auch im Hinblick auf die Stickstoffkörper der Nahrung, die Futterrationen noch nicht den ernährungswissenschaftlichen Erkenntnissen entsprechend zusammengesetzt. Der Gehalt an lebensnotwendigen Aminosäuren in einer Ration entscheidet über den Wert (wenn alle anderen Futterinhaltsstoffe in optimaler Menge und Güte enthalten sind), wobei wiederum die in der geringsten Konzentration vorliegende essentielle Aminosäure den Ausschlag gibt. Es sind also nicht die Futtermittel mit dem höchsten Rohproteingehalt die wertvollsten, sondern diejenigen, welche alle als lebensnotwendig erkannten Aminosäuren in einer dem Bedarf für optimale Leistung entsprechenden Menge enthalten. Kennt man die Bedarfszahlen der einzelnen Nutztierarten einerseits und andererseits die Eiweißzusammensetzung unserer Futterpflanzen, so ist eine wirklich physiologische Ernährung möglich.

Eine große Bedeutung in der Ernährung kommt den stickstoffhaltigen Nahrungs-
komponenten auch aus wirtschaftlichen Gründen zu; sie sind zwar teuer, jedoch
unverzichtbar für die Verwertung aller anderen Nahrungsinhaltsstoffe erfor-
derlich. So kann die beste Energie- und Wirkstoffversorgung eines Organismus
nicht voll ausgewertet werden, wenn nicht das Angebot an stickstoffhaltigen
Substanzen quantitativ und qualitativ dem Bedarf entspricht. Die physiologi-
schen Gründe für eine nach Art und Menge optimale Stickstoffzufuhr sind also
gleichzeitig wirtschaftliche. Die Bedeutung der stickstoffhaltigen Substan-
zen in der Nahrung kann etwa wie folgt angegeben werden: "Eiweiß ist der
einzige Stoff in der Welt, welcher als solcher oder in Form seiner sämtlichen
Bestandteile und in Gemeinschaft mit Wasser, Mineralstoffen und Vitaminen
alle tierischen Zellen zu ernähren vermag". Neben den essentiellen, den semi-
essentiellen und den nicht essentiellen Aminosäuren sind im Rohprotein noch
andere stickstoffhaltige Substanzen (z.B. Säureamide, Alkaloide, Ammonium-
salze, Harnstoff u.a.m.) enthalten (Grashuis 55, Morrison
56). Wiederkäuer haben kraft ihrer Pansenflora die Fähigkeit diese Körper
für die Eiweißsynthese zu verwenden. Kellner (54) spricht von der
Eiweiß-sparenden Wirkung stickstoffhaltiger Körper nicht eiweiß- oder ei-
weißbausteinartiger Substanzen bei den Wiederkäuern. Nehring (57)
hat Milchkühe mit Harnstoff gefüttert bei entsprechender Verminderung der
Rohproteinzufuhr in den natürlichen Futterstoffen und konnte feststellen, daß
der Harnstoff-Stickstoff halbwertig gegenüber dem der natürlichen Nahrung
ist. Bei Nicht-Wiederkäuern werden derartige Substanzen, die nicht Eiweiß
oder Eiweißbausteine sind, nicht oder doch nur in sehr geringem Maße
nützt.

Schon seit F i s c h e r (58) bemühen sich Wissenschaftler, die Eiweißbausteine, ihre Eigenschaften und ihre Konzentrationen in den Nahrungs- und Futterstoffen zu bestimmen. Als wohl ältestes Verfahren finden wir in der Literatur das Esterverfahren von E. F i s c h e r (46). Es beruht auf einer fraktionierten Destillation der Aminosäurenester. D a k i n (59) entwickelte das Extraktionsverfahren. Es besteht im Ausziehen der wässrigen Lösung der Aminosäuren mit Butylalkohol. Es erlaubt aber nur die Extraktion von Mono-Aminosäuren. Das Verfahren nach J o n e s (60) und F o r e m a n (62) beschränkt sich auf die Ausscheidung der Dicarbonsäuren als Calcium- und Bariumsalze, die in wässrigem Alkohol schwer löslich sind. B r a - z i e r (62) unterscheidet die Aminosäuren auf Grund der verschiedenen Lösbarkeit ihrer Kupfersalze in Wasser oder in Alkohol. Eine Vielzahl anderer Verfahren findet sich bei B l o c k und B o l l i n g (7). Alle diese Analysenverfahren beschreiben Möglichkeiten zur Trennung von Aminosäuren

für präparative Aufbereitung, zum qualitativen Nachweis und zum Teil auch für quantitative Bestimmungen. Für Reihenuntersuchungen kommen sie jedoch nicht in Frage, weil sie sehr lange dauern und kostspielig sind.

Nach Flaschenträger und Lehnartz (4) kommen für die quantitative Aminosäurenanalyse nur drei Verfahren in Betracht:

1. Chromatographische Adsorptionsanalyse
2. Elektrophorese,
3. Verteilungschromatographie.

Alle drei sind Mikroverfahren, d.h. sie arbeiten mit kleinsten Mengen (1 - 100 μ g) und garantieren eine hohe Genauigkeit.

Für Reihenuntersuchungen besonders geeignet weil schnell, billig und dabei hinreichend genau, erscheint uns die Papierchromatographie, die im Prinzip auf der Tswett'schen Adsorptionschromatographie (69) aufgebaut ist und von Martin und Synge (64), von Consden, Gordon und Martin (65), von Hesse (66), von Tiselius und Hagdahl (67) und von Brüggemann und Drepper (41) weiter entwickelt wurde.

Die vorne beschriebene Methode hat den großen Vorteil, die Aminosäurebestimmung direkt aus dem Futtermittel zu ermöglichen. Wie das Futter den Tieren vorgelegt wird, wird es auch hydrolysiert; es erfolgt keine vorhergehende Isolierung von Eiweißkörpern. Dadurch wird erreicht, daß nicht nur die im Proteinverband befindlichen, sondern auch die frei in der Pflanze vorkommenden Aminosäuren erfaßt werden.

Die notwendigen Reagentien verursachen keine großen Kosten, dabei dauern zwei Analysen nur rund 70 Stunden + Laufzeit der Chromatographiestreifen, die je nach Lösungsmittel unterschiedlich und aus Tabelle 3 ersichtlich sind.

Arbeit:

Stunden:

1. Trocknen	-
2. Mahlen	-
3. Extrahieren	25
4. Hydrolysieren	15
5. Einengen	10
6. Adsorption der Aminosäuren	4
7. Elution der Aminosäuren	2
8. Einengen	1
9. Neutralisieren und Aufnehmen	1
10. Auftragen auf die Papierstreifen	2
11. Trocknen, Entwickeln, Evakuieren, Ermittlung der Extinktionskurven und Planimetrieren	4
12. Aufsuchen der γ -Werte auf den Eichkurven)	2
Umrechnung der γ -Werte auf % Aminosäure) in der Trockensubstanz)	
13. N-Bestimmung in der Probe nach der Kjeldahl-Methode	4
	70

Die Angabe von rund 70 Stunden ist deshalb geringer zu bewerten, weil z.B. die Fettextraktion nur beobachtet zu werden braucht, und man dabei vorbereitende Arbeiten für den weiteren Analysengang leisten kann. Die Hydrolyse kann nach Temperatureinstellung des Glycerinbades und des V_2 -Stromes sich selbst überlassen bleiben. Am besten läßt man sie über Nacht ablaufen. Auch während der Adsorption und Elution kann vorbereitende Arbeit getan werden wie z.B. das Präparieren der Papierstreifen. Einige Stunden erfordert dann noch die Umwandlung der Planimeterwerte in γ -Werte, die wir durch Einsetzen in die Eichkurven finden, die Umrechnung der γ -Werte auf Prozent-Aminosäure in der trockenen Substanz und schließlich das Beziehen auf den Rohproteingehalt der Trockensubstanz. Es können leicht zwei Analysen nebeneinander ausgeführt werden, so daß in 10 Tagen zwei Pflanzenproben untersucht werden können.

Ein weiterer Vorteil der angewandten Methode ist die Tatsache, daß mit der Ninhydrinreaktion sowohl die rechts- wie linksdrehenden Aminosäuren gefärbt und ausgewertet werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, weil viele natür-

lich linksdrehenden Aminosäuren in saurer Hydrolyse zu mehr oder weniger grossen Teilen in die rechts drehende übergehen und so z.B. in den bakteriologischen Analysen-Methoden nur ~~beyngt~~ genau erfaßt werden.

Wenn von den Schwächen der verschiedenen Aminosäurenbestimmungsverfahren die Rede ist, so muß darauf hingewiesen werden, daß es sich um Untersuchungen an biologischem Material handelt, einem Material also, das ständigen Veränderungen unterworfen ist. So verändern sich unsere Pflanzen nicht nur im Wachstum, sondern auch bei der Ernte und in der Lagerung. Ebenso spielt die Auswahl des Analysenmaterials eine große Rolle. Je nachdem ob z.B. mehr Blätter oder mehr Stengel darin sind, werden andere Ergebnisse erhalten. Eine besonders auffällige Fehlerquelle bilden die unbekannten Verunreinigungen, die häufig die gleichen Rf-Werte haben wie Aminosäuren und sich diesen zulagern. Im Gegensatz zu den Aminosäuren bilden sie mit Ninhydrin nicht violette, sondern rotliche Flecke. Sie werden selbstverständlich im Extinktionsschreiben mit bewertet.

Mit diesen angedeuteten Ursachen läßt sich die Fehlergrenze des Verfahrens mit $\pm 5 - \pm 10\%$ wohl rechtfertigen. B o i s s o n a s (68) hält eine Fehlergrenze von $\pm 10\%$ an biologischem Material für durchaus annehmbar.

Tryptophan kann mit dem angewandten Verfahren nicht bestimmt werden. Es wird bei der sauren Hydrolyse bereits zerstört (T r i s t r a m 69). Histidin konnte bei den hier untersuchten Pflanzenmaterialien auf den Streifen nicht entdeckt werden. Nach adsorptiver Abtrennung der Basen durch Wofatit C liegen nach G ö t z (70) die drei Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin mit 0,5 bis 1 cm Abstand wohl abgetrennt hintereinander; Lösungsmittel und Laufzeit sind die gleichen. Es erscheint daher notwendig, bei weiteren Untersuchungen zunächst die Basen über Wofatit C abzutrennen, um eine klare Trennung von Lysin, Histidin und Arginin auf den Papierchromatogrammen zu erreichen. Methionin konnte mit seinem geringen Wert zum Teil nicht mit dem Extinktionschreiber auf dem Papierstreifen gemessen werden.

Infolge der mit anderen Aminosäuren sich überschneidenden Rf-Werte kann die Abtrennung der Aromaten durch Adsorption an Aktivkohle (s.S. 10) nicht aufgegeben werden. Ein Lösungsmittel, das hier eine bessere Trennung bewirken könnte, ist nicht bekannt. Die Lösungsmittel müssen stets frisch destilliert sein.

Aus dem oben Dargelegten geht hervor, daß die Eiweißbausteinanalyse nur in einem wohlausgestatteten Labor durchgeführt werden kann. Ihr Ergebnis ist die Aufstellung der Aminosäuren-Tabellen und der EAA-Indices für die untersuchten Vegetabilien. Beide, Aminosäurenzusammensetzung und EAA-Index sagen nichts aus über den tatsächlichen Wert eines Futtermittelrohproteins für die Bedarfsdeckung des Tieres. Maßgebend für die biologische Wertigkeit ist weniger der analytisch festgestellte Gehalt an Aminosäuren, als vielmehr Art und Menge an Aminosäuren, die tatsächlich zur Resorption kommen. Die Ausnützung der einzelnen Nahrungs-Stickstoff-Verbindungen ist abhängig davon, ob sie im Verdauungstraktus resorbiert werden können oder nicht. Daraus geht hervor, daß die Eiweißbausteinanalyse nur in Verbindung mit dem Tierversuch ernährungsphysiologische Bedeutung hat. Gleichzeitig mit der Erforschung der Aminosäurenzusammensetzung der Pflanzen muß die Ermittlung des Aminosäurenbedarfs der Tiere durchgeführt werden und zwar sollte diese besonders einbeziehen die Abhängigkeit des Bedarfs von anderen Pflanzeninhaltsstoffen, z.B. von dem Energiegehalt der Nahrung. Derartige Relationen sind in den letzten Jahren eindeutig geklärt worden (B a l d i n i und R o s e n b e r g 71, C o m b s und R o m b e r g e r 72).

Im Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung der Nahrung mit den Bedarfszahlen der einzelnen Tierarten kommt die Eignung eines Futtermittel-Rohproteins für diese oder jene Tierart bei einer bestimmten Leistung zum Ausdruck. Solche Bedarfszahlen existieren bisher nur für Mastschweine, Legehennen, Küken, Ratten, Puten und für den Menschen (z.B. A l m q u i s t 50, B e e s o n 51).

So zeigt z.B. die nachstehende Tabelle die von A l m q u i s t und B e e s o n aufgestellten Bedarfszahlen, die sich bei ausreichender Menge und Qualität der anderen Nahrungskomponenten verstehen (Kohlenhydrate, Fette, Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente.)

Tabelle 9

Bedarfszahlen für abgesetzte Ferkel nach
Almquist (50) und Beeson (51)

	% in der Gesamtkost 1. Nach Almquist	% in der Gesamtkost 2. nach Beeson
Rohprotein	20	11,3
Tryptophan	0,2	0,2
Phenylamin	+	0,9
Histidin	+	0,4
Lysin	x 0,8 - 1,10	1,0
Arginin	+	0,2
Methionin	0,4	0,6
Threonin	0,6	0,4
Leucin	+	0,8
Isoleucin	x 0,6 - 0,7	0,7
Valin	x 0,6	0,4

x = bei anderem Rohproteingehalt der Nahrung bestimmt

+ = erforderlich, Bedarfsmenge nicht bekannt.

Selbstverständlich müssen neben den essentiellen Aminosäuren auch noch andere stickstoffhaltige Verbindungen in der Nahrung enthalten sein für die Synthese der nicht essentiellen Aminosäuren, die für den Aufbau des körpereigenen Eiweißes notwendig sind. Außerdem ergibt sich mit dem Wissen um die Aminosäurezusammensetzung einer minderen Futterpflanze die Möglichkeit, durch Zusatz von reinen Aminosäuren ein biologisch vollwertiges Futter daraus zu machen. Das bedeutet betriebswirtschaftlich und volkswirtschaftlich einen Fortschritt in der Intensivierung. Betriebswirtschaftlich, da viele betriebs-eigene Erzeugnisse, die bisher bewußt oder unbewußt ungenutzt den Betrieb passierten, durch Aminosäureenergänzung zu durchaus wertvollen Futtermitteln gemacht werden können. Auch Abfallstoffe können nutzbar gemacht werden. Dazu ein Beispiel von Fink (79):

Dem Bierhefe-Eiweiß fehlt eine semiessentielle Aminosäure, das Cystin. Das nur mit Bierhefe als Haupteiweißquelle gefütterte Tier kann mit diesem Rohprotein nicht nur nichts anfangen, sondern es erkrankt sogar. Neben vielen

unspezifischen Organveränderungen tritt vor allem eine spezifische Form des Leberzerfalls auf. Beim Zufügen von 2 % reinem Cystin zur Gesamtbierhefe blieben die Tiere gesund, und die Feststellung der biologischen Wertigkeit entsprach dem als vollwertig angenommenen tierischen Eiweiß.

Aus diesem Beispiel wird die Bedeutung der Eiweißbausteinanalyse für die Praxis deutlich. Kleinste bisher unbekannte Reserven könnten mobil gemacht werden und wo bisher zehn Stück Vieh ernährt wurden, können dann elf oder zwölf Stück gehalten werden. Darin liegt der volkswirtschaftliche Gewinn.

Aber nicht nur für die Ernährung der Tiere ist diese Möglichkeit gegeben. Auch die menschliche Nahrung kann auf diese Art und Weise modifiziert werden. In Kriegszeiten, bei Einfuhrsperren und Verknappungen z.B. können tierische Produkte durch Vegetabilien mit "vollwertigem Eiweiß" ersetzt werden (Kühnau 74).

Der Verbesserung der pflanzlichen Futtermittel durch Zusatz reiner Aminosäuren vorzuziehen wäre die Verbesserung der Aminosäurezusammensetzung der Pflanzen durch natürliche und künstliche Düngung oder durch Züchtung solcher Pflanzen mit günstigeren Aminosäurezusammensetzungen. Diese Möglichkeiten werden zur Zeit an vielen deutschen und ausländischen Instituten erprobt. Von der Möglichkeit der Rohproteinsteigerung durch Stickstoffdüngung war bereits die Rede. Das ist aber keine echte Qualitätssteigerung, bezogen auf die biologische Wertigkeit. Auch die Selektion scheint zu keinem positiven Ergebnis zu führen. Wahrscheinlich ist, daß die Aminosäurezusammensetzung artspezifisch und unabhängig von äußeren Einflüssen ist. Auf die Frage der Wertigkeitssteigerung von Pflanzeneiweißen durch Voll- und Spurenelementdüngung geben die Ergebnisse unserer Untersuchungen negative Antwort.

Sowohl die Rohproteingehalte der Pflanzen wie auch die Aminosäurenkonzentrationen im Rohprotein und die EAA-Indices zeigen zwar steigende und fallende Tendenzen, doch können diese Unterschiede nicht als eine Folge der verschiedenen Düngung ausgelegt werden. Auch in den Untersuchungen, die im Vorjahr am hiesigen Institut an den gleichen Wiesenpflanzen durchgeführt wurden, konnten Düngungsunterschiede nicht festgestellt werden. Vielleicht können weitere jährlich durchgeführte Analysen das Ergebnis noch bekräftigen. Der einzige Unterschied zwischen den Ernteuntersuchungen von 1954 und denen von 1955 liegt in einer geringgradigen Steigerung der Rohproteingehalte bei den letzteren.

Rohproteinsteigerungen können nach Meinung von N e h r i n g (75) durch Stickstoffdüngung wohl erreicht werden, doch ist damit keine Erhöhung der biologischen Wertigkeit verbunden. Ganz im Gegenteil konnte festgestellt werden, daß mit steigendem Rohproteingehalt die biologische Wertigkeit herabsinkt. Ob dies eine Folge erhöhter Amidkonzentrationen oder eine Folge von in größeren Mengen vorliegenden nicht essentiellen Aminosäuren ist, wurde bisher nicht geklärt.

Wenn hier die Rede von Pflanzenfuttermittelverbesserung durch künstliche und natürliche Düngung ist, so kann nur eine Änderung der Aminosäurezusammensetzung gemeint sein, die eine Erhöhung der biologischen Wertigkeit bringt. Einen solchen Einfluß können wir aus unseren Analyseergebnissen nicht ablesen.

V. Zusammenfassung

1. Es wird ein Verfahren ~~beschrieben~~ ^{entwickelt}, das es erlaubt, die natürlich in Pflanzen vorkommenden Aminosäuren qualitativ und quantitativ direkt aus Futtermitteln zu bestimmen. Die Bestimmung erfolgt nach saurer Hydrolyse durch absteigende eindimensionale Papierchromatographie.
2. Es werden die Aminosäuregehalte von verschiedenen Gräsern, Kräutern und Kleearten bekanntgegeben samt de zugehörigen EAA-Indices (= Essential-Amino-Acid-Index).
3. Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse an gleichen Pflanzen, die in verschieden gedüngtem Boden aufgewachsen sind, weisen darauf hin, daß die Aminosäurezusammensetzung innerhalb der Pflanzenarten konstant ist und die Voll- und Spurenelementdüngungen keinen Einfluß auf Zusammensetzung und Menge der Aminosäuren in den untersuchten Pflanzen ausüben.

VI. Literaturverzeichnis

1. Thomas, K. Arch.Anat. und Phys. 219 (1909)
2. Abderhalden, E.,
Funk, C.: Hoppe-Seyler's Z. 64, 436 (1910)
3. Schormüller, J.: Ernährung u. Verpflegung 4, 93 (1949)
4. Flaschenträger, B.,
Lehnartz, E.: Physiol.Chem., Teil 1: Die Stoffe Springer-
Verlag, Göttingen-Hamburg (1951) S.
5. Drepper, K.: Diss. Kiel (1952)
6. Lindström, H. J. biol. Chem. 138, 445 (1941)
7. Block, R.J.,
Bolling, D.: The Amino Acid Composition of Proteins and
Foods. 2. Aufl., C.C. Thomas Publ.
Springfield, III. USA (1951)
8. Brüggemann, J.,
Drepper, K.: Bisher unveröffentlichte Arbeiten des
Instituts für Physiologie und Ernährung
der Tiere, München.
9. Kofrany, E.: Hoppe-Seyler's Z. 283 14 (1948)
10. Täufel, K.,
Tvainsky, H.: Biochem. Z. 323 299 (1952)
11. Tiselius, A.,
Drake, B.,
Hagdahl, L.: Experientia, 3, 21 (1947)
12. Tswett, M.: Nature, 164, 857 (1949)
13. Zechmeister, L.,
v. Cholnoky, L.: Die Chromat. Adsorptions-Analyse.
Springer-Verlag, Wien (1937)

14. Tswett, M.: Ber.deutsch chem.Ges., 24 316 (1906)
15. Consden, R.,
Gordon, A.,
Martin, A.: Biochem. J., 38, 224 (1944)
16. Turba, F.: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch d.
Physiol.Pathol.Chem. Analyse.
Springer-Verlag, Berlin (1955) (S. 1648)
17. Turba, F.: Hoppe.-Seyler's Z., 283, 19 (1940)
18. Cramer, F.: Papierchromatographie.
Verlag Chemie-Weinheim (1952)
19. Brüggemann, J.,
Drepper, K.: Unveröffentlichte Arbeiten des Instituts
für Physiologie und Ernährung der Tiere,
München.
20. Flaschenträger, B.,
Lehnartz, E.: Lehrbuch d. physiol. Chemie.
München (1926)
21. Tiselius, A.: Diss., Uppsala (1930)
22. Klein, G.: Handbuch d. Pflanzenanalyse, Bd. 4
Verlag Springer-Wien (1931)
23. Lintzel, B.: Biochem. Zeitg., 508, 413 (1941)
24. Cannon, P.R.: Advances in Protein Chem. II,
N.Y. (1945)
25. Dunn, M.S.,
Rockland, L.: Proc.Soc.Biol.a.med., 6 a, 377 (1947)
26. Flaschenträger, B.: Physiol.Chem. Lehr- und Handbuch.
Springer-Verlag (1951)
27. Kickhofen, B.,
Westphal, O.: Naturforschung, 76, 659 (1952)

28. Edlbacher, S., Lehrbuch der physiol. Chemie. Berlin (1954)
Leuthardt, F.: Walter de Gruyter-Verlag.
29. Turba, F.: Chromatogr. Method. i.d. Proteinchem.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1954)
30. Peach, K., Modern Methods of Plant Analysis.
Tracy, M.V. Verlag-Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
4, 65 (1955)
31. Hoppe/Seyler/
Thierfelder: Handbuch d. physiol., pathol. chem. Analyse
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1955)
32. Hoffmann, R.: Diss., München (1955)
33. Wieland, Th.: Hoppe-Seyler's Z., 273, 24 (1942)
34. Decker, P., Chemiker-Z., 74, 261 (1950)
Riffart, W.:
35. Drepper, K.: Diss., München (1954)
36. Block, R.J., Science, N.Y., 103, 608 (1948)
Bolling, D.:
37. Fischer, R., Nature, 161, 769 (1948)
Pearsons, G.,
Morrison, D.:
38. Naftalin, L.: Nature, 161, 763 (1948)
39. Van Slyke, D.D.: J. biol.Chem., 150, 251 (1943)
40. Hinsberg, K., Med.Chem., S. 435 (1954)
Lang, K.: Verlag Urban & Schwarzenberg, München-
Berlin.
41. Brüggemann, J., Naturwiss., 39, 301 (1952)
Drepper, K.:

42. Moore, S., J. biol. Chem., 176, 368 (1948)
Stein, W.:
43. Buri, H.: Diss., München (1954)
44. Redfield, R., Arch. of Biochem. a. Biophys., 35,
Barron, G.: 443 (1952)
45. Acher, R.C., Biochem. Biophysica Acta, N.Y., 5
Fromageot et
Jusitz, M.:
46. Fischer, E.: Z. für Phys. und Chemie, 44, 499, (1920)
47. Abderhalden, E.: Hoppe-Seyler's Z., 66, 13 (1910)
48. Grassmann, W., Ärztl. Forschung., 4, 17 (1950)
Meyer, W.,
Waldschmidt-Leitz, E.:
49. Liebig, J. v. Chem.Briefe, 4. Aufl., Leipzig und
Heidelberg (1859)
50. Almquist, H.J.: J. Nutr., 34, 543 (1947)
51. Beeson, W.M.: Feedstuffs, 29, 10 (1951)
52. Geiger, E.J.: J. Nutrit., 34, 97 (1947)
53. Oser, B.: J. of Americ. Diet Assoc., 27, 396 (1951)
54. Kellner, O.: Die Ernährung der landw. Nutztiere.
Verlag Parey-Berlin (1950)
55. Grashuis, S.: Dollmatige Varkenfoeding.
2. Aufl., De Shothorst, Hoogland
(1950)

56. Morrison, F.B.: Feeds, and Feeding, The Morrison Publishing
Comp. (1951)
57. Nehring, K., Landw. Versuchsst., 128, 132 (1937)
Schramm, M.:
58. Fischer, E.: Hoppe-Seyler's Z., 33, 151 (1901)
59. Dakin, H.D.: Biochem. J., 12, 290 (1918)
60. Jones, D.B. J. biol. Chem., 46, 347 (1921)
Johns, C.D.:
61. Foremann, F.: Biochem. J., 13, 376 (1919)
62. Brazier, N.A.B.: Biochem. J., 24, 1188 (1930)
63. Tswett, M.: Ber. deutsch chem. Ges., 24, 316, (1906)
64. Martin, A.J.B., Biochem. J., 35, 1358 (1941)
Syngé, R.L.M.:
65. Gordon, H., Biochem. J., 42, XI (1948)
Martin, A.J.B.,
Consdon, R.A.:
66. Hesse, G.: Angew. Chem. (A) 59, 220 (1947)
67. Tiselius, A., Experientia (Basel), 3, 651 (1947)
Drake, P.,
Hagdahl, O.:
68. Boissonas, R.A., Experientia (Basel) 9 425 (1952)
Bianco, S.L.:
69. Tristram, G.R.: Biochem. J., 40, 721 (1946)
70. Götz, M.: Diss., München (1955)

71. Baldini, J.T., Poultry Science, 34, 6 (1955)
 Rosenberg, H.R.
72. Combs, G.F., Feed Age, University Maryland (1955)
 Romberger, G.L.:
73. Fink, H.: Wochenschrift für Brauerei, Nr. 1 - 9
 vom 26.2.44.
74. Kühnau, J.: Qualitätstagung, Rüdesheim (1955)
75. Nehring, K.: Landw. Forschung, 4. Sonderheft (1955)
76. Schuphan, W.: Qualitätstagung, Rüdesheim (1955)
77. Martin, A.S.P., Eudeavour, 6, 21 (1947)
 Synge, R.L.M.:

Tabellenverzeichnis:

Seite:

Tabelle 1:	Adsorbentien nach T i s e l i u s , D r a k e und M a g d a h l	10
Tabelle 2:	Aminosäuregruppen nach T i s e l i u s	11
Tabelle 3:	Lösungsmittel für die einzelnen Aminosäuregruppen	23
Tabelle 4:	Rf-Werte nach W i e l a n d , C o n s d e n , D e c k e r und H o f f m a n n	25
Tabelle 5:	Rf-Werte der Aromaten nach D r e p p e r	25
Tabelle 6:	Chromatographiedauer in verschiedenen Lösungsmitteln	28
Tabelle 7:	Aminosäurenanteile im Rohprotein der untersuchten Wiesenpflanzen	40
Tabelle 8:	EAA-Indices der Untersuchungspflanzen	45
Tabelle 9:	Bedarfszahlen nach A l m q u i s t und B e e s o n	52

Herrn Professor Dr. Dr. Johs. Brüggen
sage ich an dieser Stelle meinen Dank für die Über-
lassung des Themas und die Gewährung eines Arbeits-
platzes in seinem Institut.

Mein Dank gilt auch Herrn Privatdozenten Dr. Dr.
Kraft Drepper, der mir bei der Durchführung
meiner Arbeit jederzeit mit Rat und Tat beistand.

L e b e n s l a u f

Am 4. Februar 1931 bin ich zu Frankenthal in der Pfalz als drittes Kind meiner Eltern geboren. Mein Vater, Franz Schneider, war dort als selbständiger Dipl.-Architekt tätig. Als ich fünf Jahre alt war, starb er und die Erziehung lag allein in Händen meiner Mutter Katharina, geb. Haas.

Vier Jahre lang besuchte ich die Volksschule und anschließend neun Jahre die Oberrealschule in Frankenthal. Im Juni 1950 legte ich die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1950/51 leistete ich Aufbaudienst am Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München und konnte mich daraufhin im Sommersemester 1951 bei der tierärztlichen Fakultät der Universität München einschreiben. Im Studienjahr 1953/54 studierte ich an der Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort in Paris. Im Wintersemester 1954 kam ich wieder an die tierärztliche Fakultät München zurück und beendete am 7. Dezember 1955 das Staatsexamen. Seitdem bin ich mit der vorliegenden Dissertationsarbeit beschäftigt.

